

2m11.2665.18

Université de Montréal

**Études des propriétés thermiques, cinétiques et électrophorétiques de la
phosphoénolpyruvate carboxylase (PEPC, EC.4.1.1.31) chez deux
populations d'*Echinochloa crus-galli* (L.) Beauv.**

par

Nathalie Hamel

Département de sciences biologiques

Faculté des arts et des sciences

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de
Maître ès sciences (M. S.c.)

Octobre, 1998

© Nathalie Hamel, 1998

Université de Montréal



3 mil 2000 10

QH

302

454

1999

V.001

Université de Montréal

Études des propriétés thermiques, cinétiques et électrophorétiques de la phosphoenolpyruvate carboxylase (PEPC, EC 4.1.1.31) chez les populations d'*Echinochloa crus-galli* (L.) Beauv.

par

Nathalie Hamel

Département de sciences biologiques
Faculté des arts et des sciences

Membre invité à la Faculté des études avancées
en vue de l'obtention du grade de
Maître en sciences (M.Sc.)

Octobre 1999

© Nathalie Hamel 1999

Université de Montréal



Université de Montréal

Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé:

Études des propriétés thermiques, cinétiques et électrophorétiques de la phosphoénolpyruvate carboxylase (PEPC, EC.4.1.1.31) chez deux populations d'*Echinochloa crus-galli* (L.) Beauv.

Présenté par:

Nathalie Hamel

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes:

Président du jury	André Bouchard
Directeur de recherche	Jean-Pierre Simon
Membre du jury	Hargurdeep S. Saini

Mémoire acceptée le: 7 décembre 1998

Sommaire

Deux populations de la graminée de type C_4 *Echinochloa crus-galli* (L.) Beauv. provenant du Québec (QUÉ) et du Mississippi (MISS) ont été étudiées afin de détecter la possibilité qu'il y ait des différences dans les propriétés thermiques et cinétiques ainsi que dans les patrons électrophorétiques de l'enzyme Phosphoéno/pyruvate carboxylase (PEPC, EC 4.1.1.31).

Les populations ont été soumises à un régime de température de croissance de 26/20°C (jour 16 heures/nuit 8 heures). La thermostabilité, la stabilité à basse température, l'énergie d'activation apparente (E_a), la constante de Michaelis-Menten (PEP et Mg^{2+}), le V_{max} (PEP et Mg^{2+}) et les ratios V_{max}/K_m (PEP et Mg^{2+}) ont été analysés en fonction de la température d'essai et de la population d'origine. Les propriétés enzymatiques d'extraits non purifiés (filtration à travers colonne de séphadex G-25) furent comparées à celles de l'enzyme obtenue suite à deux étapes de purification; partielle (centrifugation différentielle au polyéthylène glycol) et complète (chromatographie sur colonne de DEAE-sépharose). Le taux de remplacement (K_{cat}), l'activité spécifique, la mobilité électrophorétique ainsi que le point isoélectrique de l'enzyme purifiée ont également été analysés chez les deux populations.

Les patrons électrophorétiques de la PEPC des deux populations indiquent la présence d'une seule forme isoenzymatique ayant un poids moléculaire identique pour l'enzyme native (400 kDa) et pour les sous-unités du tétramère (100 kDa). Le point isoélectrique de la PEPC est identique pour les deux populations (pI 4,95). La thermostabilité est significativement plus élevée chez MISS que chez QUÉ, et ce pour deux des trois niveaux de purification (extraits non purifiés et partiellement purifiés). Les K_m (PEP) diminuent en fonction des températures d'essai et sont significativement inférieurs pour la population du QUÉ, et ce pour chacun des niveaux de purification. Les rapports V_{max}/K_m de la PEPC augmentent en fonction des températures d'essai et sont significativement supérieurs pour la populations du QUÉ, pour les deux premiers niveaux de purification. Les K_{cat}

augmentent en fonction de la température d'essai et sont supérieurs pour QUÉ aux basses températures d'essai (5°C à 15°C) et supérieurs pour MISS aux températures plus élevées (20°C à 40°C). Des différences significatives entre les populations sont perçues au niveau de la thermostabilité et des K_{cat} (PEP) (aux températures d'essais plus élevées) ainsi qu'au niveau des K_m (PEP) et des rapports V_{max}/K_m (PEP). Ces résultats suggèrent qu'une adaptation aux niveaux de certaines propriétés thermiques et cinétiques de PEPC s'est produite chez *Echinochloa crus-galli* en réponse aux pressions de sélections associées au milieu d'origine des espèces. De plus les différences entre les degrés de purification laissent sous-entendre que l'augmentation de la purification atténue les différences entre les populations et ainsi réduit l'expression du phénomène adaptatif. En comparant les trois niveaux de purification, il ressort que la PEPC partiellement purifiée suite à une précipitation au polyéthylène glycol permet de différencier mieux les paramètres de la PEPC extraite des deux populations d'*Echinochloa crus-galli* provenant de milieux thermiques contrastants.

Table des matières

Sommaire	iii
Table des matières.....	v
Liste des tableaux	viii
Liste des figures.....	x
Listes des abréviations.....	xiii
Remerciements.....	xv
CHAPITRE I: INTRODUCTION	
1.1 Introduction générale.....	2
1.2 Problématique de l'étude.....	8
1.3 Écologie d' <i>Echinochloa crus-galli</i>	13
1.4 Physiologie d' <i>Echinochloa crus-galli</i> :le cycle C ₄	15
1.5 Rôles et propriétés de la PEPC.....	20
CHAPITRE II. MATÉRIEL ET MÉTHODE	
2.1 Conditions de croissance.....	25
2.2 Extraction enzymatique et préparation des extraits crus.....	26
2.3 Extraction enzymatique et purification partielle et complète.....	27
2.4 Étude des propriétés physiques de la structure moléculaire.....	28
2.5 Chlorophylle et protéines.....	32
2.6 Analyses spectrophotométriques.....	33
2.6.1 Activité spécifique.....	33
2.6.2 Thermodénaturation à haute température.....	34
2.6.3 Stabilité aux basses températures.....	34
2.6.4 Énergie d'activation apparente (E _a)	35
2.6.5 Constante de Michaelis-Menten (K _m) et vitesse maximale (V _{max})..	35
2.6.6 Indicateur du pouvoir catalytique (K _{cat}).....	36
2.7 Analyses statistiques.....	37

CHAPITRE III: RÉSULTATS

3.1	Électrophorèse et purification de la PEPC.....	39
3.1.1	Purification de la PEPC.....	39
3.1.2	Poids moléculaire de la PEPC.....	39
3.1.3	Point isoélectrique de la PEPC.....	42
3.1.4	Activité spécifique de la PEPC.....	44
3.1.5	Dosage de protéines.....	44
3.1.6	Dosage de la chlorophylle (totale).....	44
3.2	Propriétés thermiques de la phospho <i>éno</i> pyruvate carboxylase....	45
3.2.1	Thermostabilité à 47°C.....	45
3.2.2	Stabilité aux basses températures (0°C).....	48
3.3	Propriétés cinétiques de la PEPC.....	50
3.3.1	Énergie d'activation apparente (E_a).....	50
3.3.2	Constante de Michaelis-Menten (K_m apparent).....	52
3.3.3	Vitesse maximale (V_{max}).....	57
3.3.4	Rapports V_{max}/K_m	59
3.3.5	Indicateur du pouvoir catalytique (K_{cat}).....	63
3.4	Récapitulation.....	66

CHAPITRE IV: DISCUSSION

4.1	Propriétés électrophorétiques.....	68
4.1.1	Poids moléculaire.....	68
4.1.2	Point isoélectrique (pI).....	69
4.2	Activité spécifique et contenu en protéines des extraits.....	72
4.3	Chlorophylle.....	74

4.4	Propriétés thermiques.....	75
4.4.1	Thermodénaturation à 47°C.....	75
4.4.2	Stabilité à 0°C.....	79
4.5	Propriétés cinétiques.....	80
4.5.1	Énergie d'activation apparente.....	80
4.5.2	Le K_m (PEP) et le K_m (Mg^{2+}).....	82
4.5.3	La vitesse maximale (V_{max}) et le rapport V_{max}/K_m	85
4.5.4	Le pouvoir catalytique: K_{cat}	87
4.6	Considération générale.....	88
	CHAPITRE V: CONCLUSION	91
	Références.....	94
	Annexes.....	xix

Listes des tableaux

Tableau 1. Différences statistiquement significatives entre les plantes QUÉ et MISS d' <i>Echinochloa crus-galli</i> au niveau des propriétés thermiques et cinétiques des enzymes C ₄ (modifié de Potvin et Simon 1990).....	12
Tableau 2. Étapes de purification de la phosphoénolpyruvate carboxylase extraite de deux populations d' <i>Echinochloa crus-galli</i> . Les valeurs représentent, pour chaque population, les moyennes de trois séries de purifications réalisées à partir d'extractions indépendantes.....	39
Tableau 3. Tableau comparatif des poids moléculaires de la PEPC d' <i>Echinochloa crus-galli</i> avec ceux d'autres espèces rapportés dans la littérature.....	40
Tableau 4. Valeur des F et degré de signification des tests d'ANOVAR pour les valeurs transformées ($\arcsin\sqrt{P}$) de thermodénaturation à 47°C...	46
Tableau 5. Valeurs des F et degré de signification des tests d'ANOVAR pour les valeurs de stabilité à 0°C.....	48
Tableau 6. Valeurs des F et degré de signification des tests d'ANOVAR pour les valeurs d'E _a	50
Tableau 7. Valeurs des F et degré de signification des tests d'ANOVAR pour les valeurs de K _m (PEP).....	54
Tableau 8. Valeurs des F et degré de signification des tests d'ANOVAR pour les valeurs de K _m (Mg ²⁺).....	54

Tableau 9. Valeurs des F et degré de signification des tests d'ANOVAR pour les valeurs de V_{\max} (PEP).....	57
Tableau 10. Valeur des F et degré de signification des tests d'ANOVAR pour les valeurs des rapports V_{\max}/K_m (PEP).....	60
Tableau 11. Valeur des F et degré de signification des tests d'ANOVAR pour les rapports V_{\max}/K_m (Mg^{2+}).....	60
Tableau 12. Valeur des F et degré de signification des tests d'ANOVAR pour les K_{cat}	64
Tableau 13. Tableau récapitulatif des différences, telle que déterminées par les ANOVAR, dans les propriétés thermiques et cinétiques des extraits crus, partiellement purifiés et purifiés de la PEPC entre les plantes QUÉ et MISS d' <i>Echinochloa crus-galli</i>	66

Listes des figures

- Figure I.** Plantes d'*Echinochloa crus-galli* (L.) Beauv. des deux populations étudiées (Québec et Mississippi) après quatre semaines de croissance à une thermopériode de 26°/ 20°C (jour/nuit) et une photopériode de 16 heures. Photo prise au phytotron de l'Université Duke par J.-P. Simon. 10
- Figure II.** Moyennes des températures minimales (●) et maximales (●) mensuelles enregistrées aux localités d'origine de la population **QUÉ** et **MISS** d'*Echinochloa crus-galli*. Les durées des phases végétative (V) et reproductive (R) de chaque écotype dans son milieu naturel sont indiquées. (Figure reprise et modifiée de Simon, Potvin et Strain 1984). ... 11
- Figure III.** Déroulement des réactions au cours du cycle dicarboxylique en C₄ de type NADP-ME. Enzymes prenant part aux réactions: ① anhydrase carbonique, ② phosphoéno/pyruvate carboxylase, ③ déshydrogénase malique NADP-dépendante, ④ enzyme malique NADP-dépendante, ⑤ pyruvate orthophosphate dikinase. HCO₃⁻, bicarbonate; OAA, oxaloacétate; PEP, phosphoéno/pyruvate. 18
- Figure IV.** Photographie d'un gel d'acrylamide de la PEPC native pour les deux populations QUÉ et MISS d'*Echinochloa crus-galli* comparée à la PEPC native purifiée du maïs (*Zea mays*) (SIGMA Chemical Company, St-Louis, MO). 41
- Figure V.** Photographie du gel électrophorétique avec une teinture spécifique à la PEPC native (Kärn *et al.* 1973) pour les deux populations QUÉ et MISS d'*Echinochloa crus-galli*. 41

- Figure VI.** Photographie du gel d'acrylamide de la PEPC dénaturée (SDS) des deux populations QUÉ et MISS d'*Echinochloa crus-galli*, et de la PEPC dénaturée du maïs (SIGMA Chemical Company, St-Louis, MO.). 42
- Figure VII.** Photographie du gel en deux dimensions de la PEPC dénaturée d'un mélange des deux populations QUÉ et MISS d'*Echinochloa crus-galli*. Des gels réalisés avec un extrait de PEPC purifié de *Zea mays* (SIGMA Chemical Company, St-Louis, MO) donnent un résultat identique. 43
- Figure VIII.** Photographie d'un gel d'acrylamide à gradient de pH (3-10) pour la détermination du point isoélectrique de la PEPC non dénaturée pour les deux populations QUÉ et MISS d'*Echinochloa crus-galli* comparé au point isoélectrique de PEPC non dénaturée purifiée du maïs (*Zea mays*) (SIGMA Chemical Company, St-Louis, MO). 43
- Figure IX.** Thermodénaturation de la PEPC exprimée en log du pourcentage d'activité résiduelle en fonction de la durée de dénaturation à 47°C pour les populations Mississippi et Québec d'*Echinochloa crus-galli*, à chaque niveau de purification. 47
- Figure X.** Stabilité de la PEPC exprimée en pourcentage d'activité résiduelle en fonction de la durée de dénaturation à 0°C pour les populations Mississippi et Québec d'*Echinochloa crus-galli*, à chaque niveau de purification. 49
- Figure XI.** Énergie d'activation apparente (E_a) de la PEPC en fonction des coefficients thermiques, exprimée en KJ/mol, des plantes d'*Echinochloa crus-galli* du Québec (QUE) et du Mississippi (MISS), aux trois niveaux de purification. 51

- Figure XII.** Constante de Michaelis-Menten (K_m) (PEP) de la PEPC exprimée en mmol, à différentes températures d'essai, pour les extraits crus, partiellement purifiés et purifiés des plantes d'*Echinochloa crus-galli* du Québec et du Mississippi. 55
- Figure XIII.** Constante de Michaelis-Menten (K_m) (Mg^{2+}) de la PEPC, exprimée en mmol, à différentes températures d'essais, pour les extraits crus, partiellement purifiés et purifiés des plantes d'*Echinochloa crus-galli* du Québec et du Mississippi. 56
- Figure XIV.** Vitesse maximale (V_{max}) (PEP) de la PEPC, exprimée en μmol de PEP min^{-1} , à différentes températures d'essais, pour les extraits crus, partiellement purifiés et purifiés des plantes d'*Echinochloa crus-galli* du Québec et du Mississippi. 58
- Figure XV** Rapports V_{max}/K_m (PEP) de la PEPC, exprimés en μmole NADH oxydé par mg^{-1} protéine $\text{min}^{-1}/\text{mM}$ PEP, aux différentes températures d'essais, pour les extraits crus, partiellement purifiés et purifiés des plantes d'*Echinochloa crus-galli* du Québec et du Mississippi. 61
- Figure XVI.** Rapports V_{max}/K_m (Mg^{2+}) de la PEPC, exprimés en μmole NADH oxydé par mg^{-1} protéine $\text{min}^{-1}/\text{mM}$ Mg^{2+} , aux différentes températures d'essais, pour les extraits crus, partiellement purifiés et purifiés des plantes d'*Echinochloa crus-galli* du Québec et du Mississippi. 62
- Figure XVII.** Activité moléculaire (K_{cat}) (PEP) de la PEPC purifiée (DEAE-sépharose) aux différentes températures d'essais exprimé en s^{-1} , des plantes d'*Echinochloa crus-galli* du Québec et du Mississippi. 65

Liste des abréviations

ASP:	Persulfate d'ammonium
Beauv.:	Beauvois (Palisot de)
Da:	Dalton
DEAE:	Diéthyl amino éthyle
DTT:	Dithiothréitol
E:	Est (géographique)
E _a :	Énergie d'activation
EDTA:	Acide éthylènediamide tétraacétique
g :	Gramme
Hepes:	Acide hydroxyméthyl piperazine éthanesulphonique
J:	Joules
K _{cat} :	Indicateur du pouvoir catalytique
K _m :	Constante de Michaelis-Menten
KCl:	Chlorure de potassium
KOH:	Hydroxyde de potassium
L.:	Linné (Carl von)
Lat;	Latitude
ln:	Logarithme naturel
log:	Logarithme en base 10
Long:	Longitude
M:	Mole
MDH:	Déhydrogénase malique
mg:	Milligramme
min:	Minute
ml:	Millilitre
mM:	Millimole
MgCl ₂ :	Chlorure de magnésium
MISS:	Population du Mississippi
N:	Nord (géographique)
NAD-MDH:	NAD-déhydrogénase malique
NADP ⁺ :	Nicotiamide-adénine dinucléotide phosphate, forme oxydée
NADPH:	Nicotiamide-adénine dinucléotide phosphate, forme réduite
NADP-ME:	Enzyme malique NADP-dépendante

NADP-MDH	Déhydrogénase malique NADP-dépendante
η m:	Nanomètre
OAA:	Acide oxaloacétique
PEG:	Polyéthylène glycol
PEP:	Phospho \acute{e} no/pyruvate
PEPC:	Phospho \acute{e} no/pyruvate carboxylase
pH :	Potentiel d'hydrogène
PVPP:	Polyvinyl polypyrrolidone
PyDK:	Pyruvate P _i dikinase
Q ₁₀ :	Coefficient thermique
QUÉ:	Population du Québec
SDS:	Sulfate dodécyl de sodium
sec:	Seconde
T°:	Température
Tricine:	Hydroxyméthyl méthylglycine
Tris:	Hydroxylméthyl aminométhane
μ g:	Microgramme
μ M:	Micromole
v:	vitesse
V:	Volts
V _{max} :	Vitesse maximale
°C:	Degré Celsius
K:	Degré Kelvin

Remerciements

Au terme de la réalisation de ce projet qui a occupé un peu plus de deux ans de ma vie, je prends conscience de l'importance de l'aide et du soutien de mon entourage professionnel et familial. Je tiens à exprimer ma gratitude envers toutes les personnes qui ont, de près ou de loin, professionnellement ou amicalement, contribué à la réalisation de cette étude. Plus particulièrement je tiens à remercier les personnes suivantes:

le Dr Jean-Pierre Simon. Merci Jean-Pierre de m'avoir pris sous votre aile, de votre omniprésence tout au long de la partie expérimentale de cette recherche, de vos conseils pertinents et de votre soutien constant. Vous êtes l'âme de ce projet et sans vous il n'aurait eu lieu. Un grand merci aussi pour votre vigilance et vos précieux conseils lors de l'écriture de ce mémoire. Merci aussi pour votre appui financier qui m'a évité bien des soucis.

le Dr Daniel Matton pour m'avoir accueilli temporairement dans son laboratoire et m'avoir permis d'emprunter son équipement et son temps et ... son étudiante.

Merci à Mlle Julie Poliquin qui m'a donné de son précieux temps en me transmettant ses connaissances techniques dans l'art biomoléculaire des électrophorèses en deux dimensions.

Merci grand-papa et grand-maman pour votre amour inconditionnel et votre grande générosité. Merci grand-maman pour ta foi qui produit bien des miracles. Je vous remercie aussi de m'aider à arrondir mes fins de mois.

Merci Stéphane pour: ton ordinateur, ton ordinateur portable, ta laveuse et ta sècheuse. Sérieusement, merci de m'avoir fait partager ta passion pour l'entraînement physique. Merci pour tes conseils, ta patience et ta douceur lors de

mes angoisses mensuelles. Merci pour toutes les fois que tu m'as fait rire, pour tes messages sur le «screen saver» et tout simplement merci pour ta présence.

Merci ma maman pour m'avoir inculqué l'amour de la lecture et de la connaissance. Merci pour m'avoir trimbalé à la bibliothèque et dans les musées. Merci d'avoir jadis, pris le temps de me faire réciter mes leçons. Merci pour m'avoir toujours donné confiance et pour m'avoir réconfortée si souvent. Grâce à toi je sais que je suis capable de lire tout un livre sur la libellule.

Les frais de cette étude ont été couverts grâce à une subvention octroyée au Dr Simon par le CRSNG. Je désire remercier cet organisme pour la bourse d'étude qui me fut accordée durant la seconde année de mes études de deuxième cycle universitaire. Et je désire remercier le Dr Simon de m'avoir accordé une bourse d'étude lors de la première année de la réalisation de ce projet.

À Stéphane ...

« Et en effet, sur la planète du petit prince, il y avait comme sur toutes les planètes, de bonnes herbes et de mauvaises herbes. Par conséquent de bonnes graines de bonnes herbes et de mauvaises graines de mauvaises herbes. Mais les graines sont invisibles. Elles dorment dans le secret de la terre jusqu'à ce qu'il prenne fantaisie à l'une d'elles de se réveiller. . . Alors elle s'étire, et pousse d'abord timidement vers le soleil une ravissante petite brindille inoffensive. Si il s'agit d'une brindille de radis ou de rosier, on peut la laisser pousser comme elle veut. Mais si il s'agit d'une mauvaise plante, il faut arracher la plante aussitôt, dès qu'on a su la reconnaître. Or il y avait des graines terribles sur la planète du petit prince. . . c'étaient des graines de baobab. Le sol de la planète en était infesté. Or un baobab, si l'on s'y prend trop tard, on ne peut jamais plus s'en débarrasser. Il encombre toute la planète. Il la perfore de ses racines. Et si la planète est trop petite, et si les baobabs sont trop nombreux, ils la font éclater. »

Le Petit Prince

Antoine de Saint-Exupéry

Chapitre I

Introduction

1.1 INTRODUCTION GÉNÉRALE

«Il y avait toujours eu, sur la planète du petit prince, des fleurs très simples ornées d'un seul rang de pétales, et qui ne dérangent personne. Elles apparaissent un matin dans l'herbe, et puis elle s'éteignent le soir. Mais celle-là avait germé un jour, d'une graine apportée d'on ne sait où, et le petit prince avait surveillé de très près cette brindille qui ne ressemblait pas aux autres brindilles. (...) Et puis voici qu'un matin, justement à l'heure du lever du soleil, la fleur s'était montrée. (...)

— C'est l'heure, je crois, du petit déjeuner, avait-elle bientôt ajouté, auriez-vous la bonté de penser à moi...

Et le petit prince, tout confus, ayant été chercher un arrosoir d'eau fraîche, avait servi la fleur. (...)

— ...mais j'ai horreur des courants d'air. Vous n'auriez pas un paravent?

«Horreur des courants d'air ... ce n'est pas de chance, pour une plante, avait remarqué le petit prince. Cette fleur est bien compliquée...»

— Le soir vous me mettez sous globe. Il fait très froid chez vous. C'est mal installé.»

Le Petit Prince. Antoine de Saint-Exupéry

Hélas! toutes les plantes ne sont pas choyées comme la rose du petit prince. Sur notre planète les plantes doivent se protéger par elles-mêmes. Organismes sédentaires, elles sont soumises à divers facteurs environnementaux tels la température, l'intensité lumineuse, la concentration ambiante des gaz atmosphériques, le potentiel hydrique et la composition du sol. Pour faire face à ces facteurs, qui bien souvent sont des agents de stress, les végétaux n'ont pas le choix de s'adapter afin de survivre. Chez les plantes supérieures, certaines espèces croissent uniquement dans des régions spécifiques alors que d'autres espèces, comme la majorité des mauvaises herbes, possèdent une grande amplitude écologique et se retrouvent dans des milieux diversifiés et même extrêmes (Heslop-Harrison 1964; Berrie 1977; Wittwer 1980).

Depuis plus d'un siècle, de nombreuses études ont porté sur les variations intraspécifiques des plantes en fonction de leur environnement. Déjà Vilmorin en 1862 a démontré expérimentalement la variabilité géographique du pin écossais (*Pinus sylvestris* L.) et sa corrélation avec sa répartition. De Candolle, dix ans plus tard, mentionne des variétés physiologiques à l'intérieur de certaines espèces herbacées, variétés provenant d'habitats différents (Langlet 1963). Mais, c'est

Turesson qui en 1923, suite à ses travaux sur *Achillea millefolium*, a développé et élaboré la génécologie, discipline étudiant l'écologie des différents génotypes (ou écotypes) d'une même espèce. Il a défini le terme génotype (écotype) comme une unité écologique résultant de la réponse génotypique d'une espèce face à un habitat particulier. Il constata aussi l'effet de différentes températures sur la croissance et le développement des plantes d'une même espèce (Turesson 1922, 1923). Plusieurs autres études furent réalisées sur des plantes ligneuses et herbacées, et d'après les conclusions tirées à l'époque, la variabilité écologique observée chez les espèces était attribuable principalement à la sélection naturelle, donc purement génotypique (Bradshaw 1972).

Des études furent menées dans le but d'approfondir les mécanismes d'adaptation et d'acclimatation des espèces végétales et de déterminer quelle part occupe la sélection naturelle dans l'adaptation. Les organismes ectothermes, animaux et végétaux, doivent moduler leur activité métabolique en fonction des changements environnementaux et surtout, en fonction de la température ambiante (Hochachka & Somero 1984). Cette capacité est particulièrement importante chez les plantes du fait de leur sédentarité. La sélection naturelle peut provoquer la différenciation génétique à l'intérieure d'une même espèce et donc amener à la formation d'écotypes (génotypes). La modulation des activités métaboliques peut être favorisée par la sélection naturelle, mais elle peut aussi être provoquée par la réaction physiologique immédiate (ou à court terme) par le biais de l'acclimatation physiologique sur un même génotype. On retrouve chez certaines espèces ectothermes (végétales et animales) une grande plasticité phénotypique qui leur permet de vivre dans un habitat changeant (Schlichting 1986). La plasticité phénotypique fut définie comme étant la capacité d'un organisme d'altérer sa physiologie et/ou sa morphologie en réponse aux changements des conditions environnementales. Cette plasticité est aussi déterminée par les systèmes génétiques contrôlant le développement (Bradshaw 1965; Schlichting 1986). Ainsi les plantes ayant une plus grande plasticité phénotypique peuvent réduire le nombre d'écotypes (génotypes) au long d'un gradient hypothétique d'environnements différents. Ainsi on peut distinguer l'acclimatation, soit à court terme (variation climatique journalière) et à moyen

terme (variation saisonnière) de l'adaptation (long terme). L'adaptation se fait suite à un processus évolutif qui mène à une différenciation génétique d'écotypes sur une période de plusieurs générations (Hochachka & Somero 1984).

Le métabolisme d'un organisme dépend du bon fonctionnement de ses composantes; macromolécules, acides nucléiques et enzymes. Depuis quelques décennies, les recherches orientées vers une compréhension des processus évolutifs des populations d'espèces végétales et animales se sont portées plus particulièrement sur l'étude des enzymes. Il est avantageux d'étudier des mécanismes d'adaptation via l'étude des enzymes. En effet, les enzymes sont des éléments importants du métabolisme puisqu'elles catalysent les réactions biochimiques de l'organisme. Elles sont aussi particulièrement sensibles aux variations thermiques et leurs structures et/ou leurs propriétés peuvent être modifiées suite aux pressions sélectives associées à un changement de la température du milieu (Somero 1978; Hall & Koehn 1983; Hochachka & Somero 1984).

La température affecte la structure des enzymes principalement de deux façons. Les structures tertiaires et quaternaires des protéines sont stabilisées par des liaisons faibles (liaisons hydrogènes, forces de van der Waals et interactions électrostatiques). Les variations de température agissent ainsi sur ces liaisons tout en renforçant les liens hydrophobes ce qui affecte par conséquent la stabilité thermique des enzymes. Les structures tertiaires (conformation) et quaternaire (agrégation des sous-unités) peuvent être déstabilisées par les grands écarts de température. La température intervient aussi sur les interactions entre les enzymes et les lipides membranaires.

De plus, la température en déterminant la quantité d'énergie extérieure nécessaire aux réactions enzymatiques chez les organismes ectothermes, agit sur la cinétique des enzymes. L'augmentation de la température accélère généralement la vitesse des réactions enzymatiques. Les interactions entre enzymes et ligands (substrat, co-facteur, modulateurs) sont aussi dépendants de la température, ce qui se répercute sur la régulation métabolique et l'activité

catalytique de l'enzyme. À basse température, l'enzyme doit être très efficace afin de compenser le faible apport d'énergie externe. Cette hausse d'efficacité est occasionnée par la modulation de ses propriétés cinétiques et aussi par une hausse de sa concentration ou du rapport entre ses différentes formes moléculaires. La température exerce donc une pression sélective sur les enzymes par ses effets sur l'activité catalytique de ces protéines (Hochachka & Somero 1973, 1984).

D'après Hochachka et Somero (1984) la régulation de l'activité enzymatique suite à un changement de température peut suivre trois stratégies différentes. La première, dite «quantitative», est celle où l'organisme accroît ou diminue les concentrations de ses enzymes suivant les changements de température. Cette stratégie est souvent observée lors de processus d'acclimatation. Lors de la seconde, «la stratégie modulante», les enzymes modulent leurs activités via des processus de compensation immédiate à la température. Des variations dans les valeurs de l'affinité de l'enzyme pour son substrat (K_m) sont représentatives de cette stratégie. Les variations de températures peuvent ainsi affecter les valeurs de l'énergie d'activation (E_a) (Simon 1979c). La troisième stratégie, «la stratégie qualitative», implique des modifications au niveau des propriétés catalytiques inhérentes à l'enzyme et aux formes moléculaires afin de produire un catalyseur mieux adapté à l'habitat de l'organisme (Somero 1978; Hochachka & Somero 1984).

Une approche utilisée fréquemment, lors de l'étude de l'adaptation enzymatique, est la comparaison des propriétés cinétiques des allozymes (formes moléculaires d'enzymes ayant une même fonction et se retrouvant dans un même tissu) à l'intérieur d'une même espèce. Ainsi, les différences perçues dans certains aspects de la catalyse des allozymes reflètent souvent une adaptation potentielle des enzymes. Des différences dans la catalyse peuvent se manifester de plusieurs façons (Hall & Koehn 1983) et l'analyse des paramètres cinétiques permet de caractériser et de différencier les enzymes. Parmi ceux-ci, on retrouve l'énergie d'activation apparente (E_a), la constante de Michaelis-Menten (K_m), la vitesse maximale (V_{max}), le rapport V_{max}/K_m et l'activité moléculaire de l'enzyme (K_{cat}).

Dans une réaction enzymatique, la première étape consiste dans la formation du complexe enzyme—substrat (E-S). La seconde étape de la catalyse enzymatique est la conversion du complexe E-S en un complexe activé. Pour qu'une réaction ait lieu, il faut que les partenaires de la réaction reçoivent une certaine quantité d'énergie que l'on nomme énergie libre d'activation (enthalpie d'activation (ΔG^\ddagger). L'énergie d'activation porte les partenaires de la réaction à un niveau énergétique plus élevé afin qu'ils puissent atteindre la "barrière" qui bloque la réaction. Ainsi, une basse énergie d'activation signifie une plus faible barrière (ou seuil énergétique) à franchir pour passer de la réaction $E + S \rightarrow ES \rightarrow P + E$, facilitant la réaction enzymatique (Low *et al.* 1973; Richter 1993).

La mesure de l'énergie d'activation apparente (E_a) se veut une bonne approximation de l'énergie libre d'activation, tout en étant plus facile à calculer. L' E_a est ainsi une mesure quantitative de l'efficacité catalytique (Somero 1978). L'efficacité relative d'une enzyme comme catalyseur lors d'une réaction se définit comme la vitesse initiale v (en $\mu\text{M}/\text{min}$) à laquelle une molécule d'enzyme catalyse la conversion d'un substrat en produit sous des conditions spécifiques, comparativement à une réaction non catalysée ou à la même réaction catalysée par une enzyme différente (Hall & Koehn 1983). Cette vitesse v est maximale (V_{max}) lorsque tout le substrat est lié à l'enzyme. Ainsi, les effets d'une diminution de la température sur une enzyme se font souvent ressentir par des changements au niveau du maximum d'activité catalytique à saturation de substrat (V_{max}) (Hull *et al.* 1997).

La constante de Michaelis (K_m) est souvent considérée comme un indicateur approximatif de la capacité relative d'une enzyme à se lier à son substrat. Le calcul de cette constante est une façon d'évaluer l'affinité de l'enzyme pour son substrat. Selon le modèle de Michaelis-Menten, la concentration du complexe formé par l'enzyme et le substrat est déterminante pour la vitesse de la réaction (v). Cette concentration de saturation n'est pas la même pour tous les substrats (Richter 1993). À l'intérieur des cellules, les enzymes agissent

généralement en présence d'une concentration non-saturante de substrat, elles ne fonctionnent donc pas à vitesse maximale. C'est pourquoi la constante de Michaelis-Menten se veut utile lors de l'analyse des enzymes, car ce paramètre est calculé pour des concentrations non saturées de substrats. Elle correspond à la concentration du substrat, (en mol^{-1}) pour laquelle la vitesse de la réaction enzymatique est la moitié de la vitesse maximale ($\frac{1}{2} V_{\text{max}}$). Elle a une valeur similaire à la constante de dissociation du complexe enzyme—substrat. Ainsi, plus le K_m est petit, moins de substrat est nécessaire pour atteindre la moitié de la vitesse maximale de la réaction. Une plus grande affinité de l'enzyme pour son substrat témoigne d'une plus grande efficacité catalytique de l'enzyme (Hall & Koehn 1983).

À partir des mesures de la vitesse maximale de la réaction (V_{max}) et de celles de la constante de Michaelis-Menten (K_m apparent), on peut calculer le pouvoir cinétique qui est le rapport de ces deux paramètres (Keleti & Welch 1984). Ce rapport, qui se veut une mesure des propriétés catalytiques d'une enzyme, s'avère plus précis que le K_m seul, et donne une bonne approximation de l'activité moléculaire de l'enzyme (K_{cat}) (Crowley 1975; Fersht 1985; Hall & Koehn 1983).

L'activité moléculaire de l'enzyme ou K_{cat} est le paramètre enzymatique le plus représentatif de la performance enzymatique. Il représente la quantité de molécules de substrat convertie en produit par site actif de l'enzyme par seconde. En d'autres termes, le K_{cat} exprime: la vitesse de la catalyse de l'enzyme depuis sa réaction avec le substrat, la formation du nouveau produit et sa libération jusqu'à son retour à la réaction originelle. Ainsi, plus les valeurs de K_{cat} sont élevées, plus la réaction enzymatique est efficace. Lors d'un processus d'adaptation, l'un des moyens pour les cellules d'ajuster leur activité enzymatique est de modifier leur efficacité catalytique (ou K_{cat}). Le K_{cat} offre l'avantage de permettre un ajustement de l'activité de la cellule sans que celle-ci requière un changement du nombre de molécules d'enzyme. Puisque la modification des valeurs de K_{cat} nécessite probablement des substitutions d'acides aminés dans la protéine, il est plus probable d'observer des différences dans les K_{cat} lors de la comparaison d'écotypes (Somero 1978).

D'après Somero (1978), il est possible de dériver les valeurs de K_{cat} à partir des valeurs de V_{max} lorsque l'on connaît la concentration enzymatique. Les K_{cat} d'un extrait cru ou partiellement purifié sont impossibles à déterminer car la concentration molaire $[E]$ d'une préparation non pure est difficile à mesurer. C'est pourquoi, lorsqu'on n'a pas d'enzyme purifiée, on calcule le rapport V_{max}/K_m , la V_{max} étant directement proportionnel au K_{cat} par la relation $K_{cat} = V_{max}/[E]$.

En plus des effets de la température, l'efficacité et l'activité enzymatiques peuvent être affectées par d'autres facteurs dont le pH, la concentration des différents acides aminés, protéines, sucres, ions métalliques, par un changement de phases des phospholipides de la membrane. Ces facteurs peuvent masquer ou accentuer l'effet de la température sur la cinétique des enzymes (Alexandrov 1977).

1.2 PROBLÉMATIQUE DE L'ÉTUDE

Cette étude s'inscrit dans le cadre d'une analyse à long terme sur les mécanismes d'adaptation et d'acclimatation des différentes enzymes de la voie de photosynthèse en C_4 , afin de mieux comprendre les différences dans la performance photosynthétique des écotypes septentrionaux et méridionaux des plantes C_4 . Cette analyse pourra permettre éventuellement une meilleure compréhension de la répartition géographique des espèces C_4 , ainsi qu'expliquer leur faible abondance dans les régions plus septentrionales du globe.

Depuis une quinzaine d'années, le laboratoire du professeur Jean-Pierre Simon a exécuté plusieurs travaux sur différentes populations d'*Echinochloa crus-galli*, une graminée en C_4 qui possède une large distribution géographique. Ainsi, des études comparatives furent réalisées sur les propriétés thermiques, cinétiques et électrophorétiques de l'enzyme PEP carboxylase (Robert *et al.* 1983; Simon *et al.* 1984a, b; Potvin & Simon 1990), la NADP⁺- déhydrogénase malique (Dubuc *et al.* 1988; Lapointe *et al.* 1989; Simon *et al.* 1989a, b; Vairinhos *et al.* 1990; Potvin & Simon 1990; Simon *et al.* 1991), la pyruvate, P_i dikinase (Simon 1987; Potvin &

Simon 1990; Simon & Hatch 1994), la NADP- enzyme malique (Simon 1987; Dubuc *et al.* 1988; Potvin & Simon 1990; Simon 1996). Des études d'acclimatation furent également réalisées sur ces enzymes (Potvin & Simon 1990) ainsi que des études portant sur les différences phénologiques entre trois populations d'*Echinochloa crus-galli* (Potvin 1986).

Les résultats obtenus avec la majorité des enzymes du cycle C₄ ont démontré des différences entre les populations d'*Echinochloa crus-galli* du Québec et du Mississippi (figure I). Ces résultats furent obtenus avec des extraits enzymatiques non-purifiés et partiellement purifiés. Par contre, les différences s'atténuent lorsque les études sont réalisées avec des enzymes purifiées (Potvin & Simon 1990; Simon et Vairinhos 1991; Simon 1996) (voir tableau I).

Néanmoins, tel qu'indiquée à la figure II, la différence la plus frappante se retrouve au niveau du cycle de vie (phénologie) de l'espèce étudiée. Il fut constaté que la période de croissance et de reproduction est beaucoup plus courte chez la population d'*Echinochloa crus-galli* du Québec que chez la population du Mississippi (Simon *et al.* 1984a; Potvin 1986). Ceci s'explique par le fait que les températures propices au développement de la plante s'étendent sur une plus longue période au Mississippi qu'au Québec. Long (1983) a rapporté le même phénomène pour d'autres espèces C₄. Il a constaté que l'adaptation des espèces C₄ aux climats froids dépend en grande partie de leur habilité à croître et à se reproduire durant la courte période annuelle où les températures minimales mensuelles sont supérieures à 9-10°C.



Figure 1. Plantes d'*Echinochloa crus-galli* (L.) Beauv. Des deux populations étudiées (Québec et Mississippi) après quatre semaines de croissances à une thermopériode de 26°/20°C (jour/nuit) et une photopériode de 16 heures. Photo prise au phytotron de l'Université Duke par J.-P. Simon.

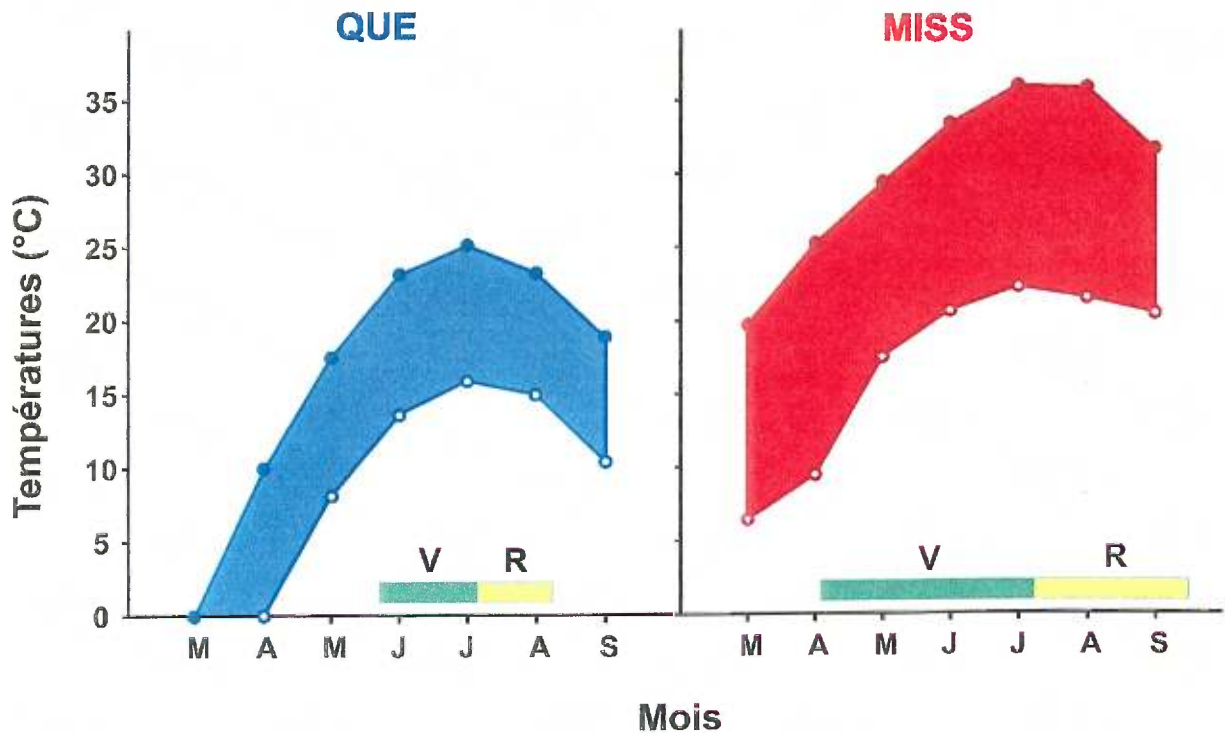


Figure II. Moyennes des températures minimales (○) et maximales (●) mensuelles enregistrées aux localités d'origine de la population **QUÉ** et **MISS** d'*Echinochloa crus-galli*. Les durées des phases végétative (V) et reproductive (R) de chaque écotype dans son milieu naturel sont indiquées. (Figure reprise et modifiée de Simon, Potvin et Strain 1984).

Parmi les enzymes du système C_4 présentes au tableau 1, la PPDK et la PEPC montrent des résultats contradictoires. La PPDK, considérée comme l'enzyme la plus limitante du système C_4 (Long 1983; Potvin *et al.* 1986; Simon 1987) ne présente pas de différence dans les propriétés cinétiques analysées (voir aussi Simon 1996). Les seules différences perçues pour cette enzyme entre les populations QUÉ et MISS résident dans l'inactivation de l'enzyme aux basses températures (voir aussi Simon 1987). Par ailleurs la PEPC présente des différences significatives entre les populations QUÉ et MISS pour plusieurs des paramètres analysés. Ces résultats semblent paradoxaux si l'on considère que contrairement à la PPDK, l'activité de cette enzyme est toujours en excès par rapport à la quantité requise par la plante pour atteindre les taux de photosynthèse observés aux mêmes conditions expérimentales (Long 1983; Simon *et al.* 1984b; Potvin & Simon 1990; Simon & Hatch 1994; Simon 1996).

Tableau I. Différences statistiquement significatives entre les plantes QUÉ et MISS d'*Echinochloa crus-galli* au niveau des propriétés thermiques et cinétiques des enzymes C₄ (modifié de Potvin et Simon 1990).

Enzyme	Propriété	Différence
PEPC*	Thermostabilité	Supérieure chez MISS
	Énergie d'activation	Inférieure chez QUÉ (Q ₁₀ 20/10 °C)
	K _m	Inférieur chez QUÉ (basses T° d'essai)
	V _{max} /K _m	Supérieur chez QUÉ (basses T° d'essai) Supérieur chez MISS (hautes T° d'essai)
NADP ⁺ -MDH*	Énergie d'activation	Inférieure chez QUÉBEC (Q ₁₀ 20/10 °C)
	K _m	Inférieur chez MISS (hautes T° d'essai)
	V _{max} /K _m	Supérieur chez MISS (hautes T° d'essai)
NADP ⁺ -ME*	Énergie d'activation	Inférieure chez QUÉ (Q ₁₀ 20/10 °C)
	V _{max} /K _m	Supérieure chez QUÉ acclimaté à 14/8°C (jour/nuit)
PPDK*	Thermostabilité (basses températures)	Supérieure chez QUÉ

*PEPC, phosphoénolpyruvate carboxylase; NADP⁺-MDH, déshydrogénase malique NADP⁺ dépendante; NADP⁺-ME, enzyme malique NADP⁺ dépendante; PPDK, pyruvate P_i dikinase.

Les analyses antérieures ont en effet démontré que la PEPC non purifiée extraite de plantes de deux populations d'*Echinochloa crus-galli* (L.) Beauv. provenant du Québec (QUÉ) et du Mississippi (MISS) possède des propriétés thermiques et cinétiques différentes. Ces résultats suggèrent un processus d'adaptation car ils sont fortement corrélés aux conditions thermiques retrouvées sur les lieux d'origine des populations ainsi qu'aux réponses de croissance et de reproduction des plantes aux conditions de basses températures (Robert *et al.* 1983; Simon *et al.* 1984 a, b; Potvin & Simon 1990). Pour être généralisables, les résultats de ces analyses doivent être reproduits et même confirmés avec ceux obtenus à partir de la PEPC purifiée. La raison d'entreprendre la purification d'une enzyme varie d'une situation à l'autre. Dans notre cas, on considère que l'enzyme non purifiée se trouve en quelque sorte protégée par le milieu d'extraction dans lequel elle se retrouve. De nombreuses études ont démontré que certains solutés organiques (polyols, cations ainsi que certains acides aminés et leurs dérivés)

protégeaient les enzymes contre plusieurs perturbations environnementales (Paleg *et al.* 1981; Krall *et al.* 1989). De plus, d'autres études ont démontré que des composés organiques (glycérol, bétaine, proline, sorbitol, sucrose) et certains polymères synthétiques inertes (polyvinylpyrrolidone et polyéthylène glycol) prévenaient l'inactivation de la PEPC extraite des feuilles de plantes (Karabourniotis *et al.* 1983; Selinioti *et al.* 1987). Ainsi, dans l'extrait enzymatique cru, on retrouve des substances de bas poids moléculaires (polyols, inhibiteurs et/ou activateurs) ainsi que certains résidus provenant des produits d'extraction (PVPP) qui peuvent influencer ou modifier l'activité de l'enzyme et ses propriétés enzymatiques. L'objectif de cette étude est donc d'analyser et de comparer les propriétés thermiques et cinétiques de la PEPC non purifiée et purifiée extraite de plantes du MISS et du QUÉ. Les propriétés électrophorétiques ainsi que le poids moléculaire de la sous-unité tétramérique de l'enzyme (Uedan & Sugiyama 1976; O'Leary 1982) et le point isoélectrique (pI) de cette enzyme seront aussi analysés avec l'enzyme purifiée.

1.3 ÉCOLOGIE D'*ECHINOCHLOA CRUS-GALLI*

Echinochloa crus-galli (L.) Beauv. variété *crus-galli* est une espèce rudérale annuelle appartenant à la tribu des Panicées, dans la famille des Poacées. Mieux connue sous les noms vernaculaires de Échinochloa Pied-de-Coq, Pied-de-Coq et «Barnyard-grass», cette espèce se reconnaît à son chaume robuste long d'environ 60 à 100 cm, ainsi qu'à son inflorescence paniculée (Figure 1). La variété *crus-galli* se différencie des autres variétés d'*Echinochloa crus-galli* par l'architecture des ses panicules (épillets peu ou point muriqués) ainsi que par ses caractéristiques écologiques (Marie-Victorin 1964; Gould *et al.* 1972; Holm *et al.* 1977).

E. crus-galli est l'une des rares espèces C₄ croissant à des latitudes supérieures à 45°C en Amérique du Nord (Teeri & Stowe 1976). Elle possède une distribution cosmopolite s'étendant du 50^{ème} degré de latitude nord au 40^{ème} degré de latitude sud (Holm *et al.* 1977; Barrett & Wilson 1981). Dans l'est de l'Amérique du Nord, sa distribution s'étend de la Floride à la péninsule Gaspésienne et à l'île

49°C) (Hitchcock 1971). Elle est présente dans les milieux cultivés, humides et autres milieux perturbés par l'activité de l'homme (Marie-Victorin 1964; Gould *et al.* 1972; Holm *et al.* 1977). Comme la plupart des plantes colonisant les milieux perturbés, *E. crus-galli* possède un développement rapide, une reproduction autogame (autofécondée), une grande plasticité phénotypique ainsi qu'une grande fécondité. Sous conditions favorables, un seul plant peut produire entre 5000 et 40 000 graines (Holm *et al.* 1977).

Echinochloa crus-galli est naturalisée d'Eurasie, et ses diverses variétés sont parmi les mauvaises herbes les plus dommageables pour l'agriculture à travers le monde, à l'exception de l'Afrique. Bien que dans certains pays des régions tropicales et au Japon on la cultive encore comme céréale d'appoint, elle perturbe plus de 36 cultures dans plus de 60 pays. Dans l'est de l'Amérique du Nord, *Echinochloa crus-galli* est considérée comme l'une des trois espèces les plus nuisibles pour la culture du maïs, plante d'un grand intérêt économique (Holm *et al.* 1977; Barrett & Wilson, 1981).

En Amérique du Nord, on retrouve sept espèces d'*Echinochloa*. Cinq sont indigènes (*E. polystachya*, *E. muricata*, *E. paludigena*, *E. walteri*, et *E. crus-pavoni*) et les deux autres, *E. crus-galli* et *E. colonum* sont des espèces introduites. Les espèces indigènes sont toutes tétraploïdes ($2n=36$) alors que les espèces introduites sont hexaploïdes ($2n=54$). L'introduction d'*E. crus-galli* au Mexique et au sud des États-Unis est ancienne, par contre sa présence au sud du Canada est plus récente.

Deux hypothèses tentent d'expliquer son introduction en terre québécoise. La première stipule que son introduction aurait suivi le retrait des derniers glaciers, voilà environ 10 000 ans. Ceci aurait perturbé l'environnement rendant le sol plus adéquat à son implantation. La seconde théorie propose qu'*E. crus-galli* est une espèce introduite suite à la colonisation des Européens au cours des derniers 300 ans. De plus, l'arrivée des colons engendra une déforestation massive, offrant ainsi plusieurs milieux ouverts propices à sa croissance (Marie-Victorin 1964; Robert *et al.* 1983). Présentement, notre laboratoire poursuit une étude connexe portant sur

de Terre-Neuve (Lat. 49°C) (Hitchcock 1971; Rouleau & Lamoureux 1992). Elle est aussi présente en Abitibi, à la même latitude, entre le Lac Duparquet et le Lac Abitibi, sur le bord des routes (Jean-Pierre Simon, Département de sciences biologiques, Université de Montréal, Montréal, communication personnelle). Elle est présente dans les milieux cultivés, humides et autres milieux perturbés par l'activité de l'homme (Marie-Victorin 1964; Gould *et al.* 1972; Holm *et al.* 1977). Comme la plupart des plantes colonisant les milieux perturbés, *E. crus-galli* possède un développement rapide, une reproduction autogame (autofécondée), une grande plasticité phénotypique ainsi qu'une grande fécondité. Sous conditions favorables, un seul plant peut produire entre 5000 et 40 000 graines (Holm *et al.* 1977).

Echinochloa crus-galli est naturalisée d'Eurasie, et ses diverses variétés sont parmi les mauvaises herbes les plus dommageables pour l'agriculture à travers le monde, à l'exception de l'Afrique. Bien que dans certains pays des régions tropicales et au Japon on la cultive encore comme céréale d'appoint, elle perturbe plus de 36 cultures dans plus de 60 pays. Dans l'est de l'Amérique du Nord, *Echinochloa crus-galli* est considérée comme l'une des trois espèces les plus nuisibles pour la culture du maïs, plante d'un grand intérêt économique (Holm *et al.* 1977; Barrett & Wilson, 1981).

En Amérique du Nord, on retrouve sept espèces d'*Echinochloa*. Cinq sont indigènes (*E. polystachya*, *E. muricata*, *E. paludigena*, *E. walteri*, et *E. crus-pavoni*) et les deux autres, *E. crus-galli* et *E. colonum* sont des espèces introduites. Les espèces indigènes sont toutes tétraploïdes ($2n=36$) alors que les espèces introduites sont hexaploïdes ($2n=54$). L'introduction d'*E. crus-galli* au Mexique et au sud des États-Unis est ancienne, par contre sa présence au sud du Canada est plus récente.

Deux hypothèses tentent d'expliquer son introduction en terre québécoise. La première stipule que son introduction aurait suivi le retrait des derniers glaciers, voilà environ 10 000 ans. Ceci aurait perturbé l'environnement rendant le sol plus adéquat à son implantation. La seconde théorie propose qu'*E. crus-galli* est une

des analyses comparatives de séquences d'ADN de populations québécoises, européennes et américaines. Les résultats de cette étude, réalisée par Sophie Roy, permettront de répondre à cette question fondamentale sur l'origine des populations québécoises d'*Echinochloa crus-galli*.

1.4 PHYSIOLOGIE D'*ECHINOCHLOA CRUS-GALLI* : LE CYCLE C₄

Echinochloa crus-galli est une plante qui photosynthétise selon la voie de type C₄ NADP-ME. Explicitement, ceci veut dire que le premier produit de la photosynthèse est un acide dicarboxylique à quatre carbones et que l'enzyme de décarboxylation est l'enzyme malique dépendante du NADP (NADP-ME).

D'une origine évolutive récente (5 à 7 millions d'années), le cycle photosynthétique en C₄ est recensé dans plus de 18 familles d'Angiospermes. Des études ont dénombré que la moitié des 10 000 espèces de Poacées et de Cypéracées sont de type C₄, dont le maïs, la canne à sucre, le millet perlé et le sorgho. On retrouve ce cycle chez une centaine d'espèces de Dicotylédones (Stowe & Teeri 1978; Teeri 1979; Teeri *et al.* 1980; Ehleringer & Monson 1993; Ehleringer *et al.* 1997). Les espèces utilisant la voie en C₄ se distinguent par un rendement photosynthétique très élevé, résultat d'une utilisation plus efficace du gaz carbonique. Bien que moins de 1% des Angiospermes utilisent la voie en C₄, ces espèces fournissent à elles seules 18% de la productivité totale et globale. Ceci est principalement dû à la grande productivité des Monocotylédones C₄ (Ehleringer *et al.* 1997).

On retrouve principalement les plantes de types C₄ dans les régions tropicales et subtropicales. L'utilisation plus efficace du CO₂ par les plantes de type C₄ a comme conséquence un plus faible besoin d'eau. En effet les échanges gazeux sont plus fructueux permettant ainsi une réduction de l'ouverture des stomates ce qui confère aux plantes C₄ un avantage considérable dans les habitats chauds et secs. La température optimale pour la photosynthèse chez les plantes C₄ est environ de 30°C-40°C, soit approximativement 10°C supérieure à la

température optimale de photosynthèse des plantes C_3 . Il a été démontré par Teeri et Stowe (1976) que la distribution et l'abondance des espèces de type C_4 en Amérique du Nord est corrélée à une température minimale élevée lors de la saison de croissance. Des études similaires en Europe et en Australie (Collins & Jones 1985; Hattersley 1983 respectivement) ont confirmé cette corrélation entre l'abondance des espèces C_4 et la température minimale. En effet, une température nocturne de 8°C , lors de la saison estivale, est considérée critique pour ces espèces (Long 1983). Toutefois, il a été démontré que certaines espèces C_4 fonctionnaient bien à basses températures (Pearcy *et al.* 1981).

Le terme C_4 (ou cycle Hatch-Slack) est employé par opposition au cycle de photosynthèse de type C_3 (ou cycle de Calvin). Ce dernier se caractérise par la fixation du CO_2 atmosphérique en un acide stable à trois carbones. La majorité des espèces utilise cette voie de photosynthèse. Les plantes C_3 se retrouvent ainsi dans toutes les régions du globe bien qu'elles soient en général mieux adaptées aux basses températures. Notons qu'il existe un troisième système photosynthétique, le métabolisme acide des Crassulacées (CAM) qui se retrouve principalement chez les espèces succulentes et semi-succulentes. La voie CAM semble être privilégiée dans des milieux arides et salins (Nelson & Langdale 1992; Ehleringer & Monson 1993).

Chez les plantes de type C_3 , un pentose, le D-ribulose-1,5-biphosphate (RuBP), joue le rôle d'accepteur du gaz carbonique. Suite à la fixation du gaz carbonique par la ribulose biphosphate carboxylase/ oxygénase (Rubisco) il se forme deux molécules d'acide 3-phosphoglycérique (3APG). Cette réaction est inhibée par l'oxygène atmosphérique à cause de la fonction oxygénase de la Rubisco. Il se produit ainsi parallèlement à la photosynthèse une fixation d' O_2 qui entraîne un rejet du carbone déjà fixé. Ce phénomène nommé photorespiration augmente avec l'intensité lumineuse et la température. Sous des conditions d'oxygène atmosphérique normales (21 KPa), la photorespiration peut réduire de 12 à 20 % la fixation du CO_2 à une température de 10°C et jusqu'à 60% à des températures de 40°C et plus (Long 1983).

Pour enrayer ce phénomène très coûteux, les plantes ont développé différents mécanismes, dont la voie de photosynthèse en C_4 . Une des particularités du cycle C_4 est la compartimentalisation des réactions photosynthétiques (anatomie de Kranz). L'anatomie foliaire présente une particularité; les cellules du mésophylle sont disposées en couronne autour des faisceaux vasculaires en deux couches distinctes. La couche externe se compose des cellules mésophylliennes (M) proprement dites. Ces cellules contiennent des chloroplastes de type grana. La couche interne se nomme gaine périvasculaire (GP); les cellules de la gaine renferment de gros chloroplastes accumulant l'amidon, mais pour la plupart dépourvus de grana (Nelson & Langdale 1992; Richter 1993). Cette anatomie particulière permet d'isoler la Rubisco de l'oxygène atmosphérique en l'emprisonnant dans la GP et un mécanisme enzymatique particulier permet de concentrer le CO_2 à l'intérieur des cellules par un facteur de 10. Le CO_2 est littéralement pompé du mésophylle vers la gaine alors que l' O_2 demeure à l'extérieur de la gaine (Hatch & Slack 1970; Rathnam & Edwards 1975; Cambell & Black 1982; Nelson & Langdale 1992).

La voie en C_4 débute dans le cytosol des cellules du mésophylle, où l'anhydrase carbonique (CA) catalyse l'hydratation du CO_2 en bicarbonate (HCO_3^-) (Hatch & Burnell 1990). Ensuite, le gaz carbonique, sous forme de HCO_3^- , est fixé sur le phosphoéno/pyruvate (PEP) au moyen de la phosphoéno/pyruvate carboxylase. L'oxaloacétate (OAA) qui résulte de cette réaction est transporté dans les chloroplastes du mésophylle où il est soit réduit en malate, soit aminé en aspartate. Les dicarboxylates ainsi formés parviennent par voie cytosolique dans les chloroplastes de la GP, où ils sont décarboxylés. Les dicarboxylates pourvoient le cycle de Calvin en CO_2 et aussi en équivalent de réduction. Le composé issu de cette décarboxylation est par la suite recyclé et retourne dans les cellules mésophylliennes (Richter 1993).

En étudiant plus en détail les réactions et les enzymes du cycle en C_4 , on distingue trois sous-groupes. Les divergences entre ces groupes sont probablement dues à l'origine polyphylétique de la voie en C_4 et touchent avant

tout la nature des métabolites du transport du carbone et celle de l'enzyme de décarboxylation (Nelson & Langdale 1992; Richter 1993).

La voie la plus étudiée est du type NADP-ME (Figure III) . Dans ce groupe, le malate assure le transport du gaz carbonique. Après avoir été hydraté, le CO_2 (HCO_3^-) est fixé sur le PEP par le biais de la PEPC dans le mésophylle. L'OAA formé passe du cytosol au chloroplaste et est réduit en malate au moyen d'une déshydrogénase malique NADP^+ -dépendante (MDH). Ce dicarboxylate est transféré dans les chloroplastes de la GP, où il est décarboxylé par l'enzyme malique NADP dépendante (NADP-ME). Du pyruvate résultant de cette réaction retourne dans le mésophylle où une pyruvate orthophosphate dikinase ATP -dépendante (PPDK) le transforme en PEP.

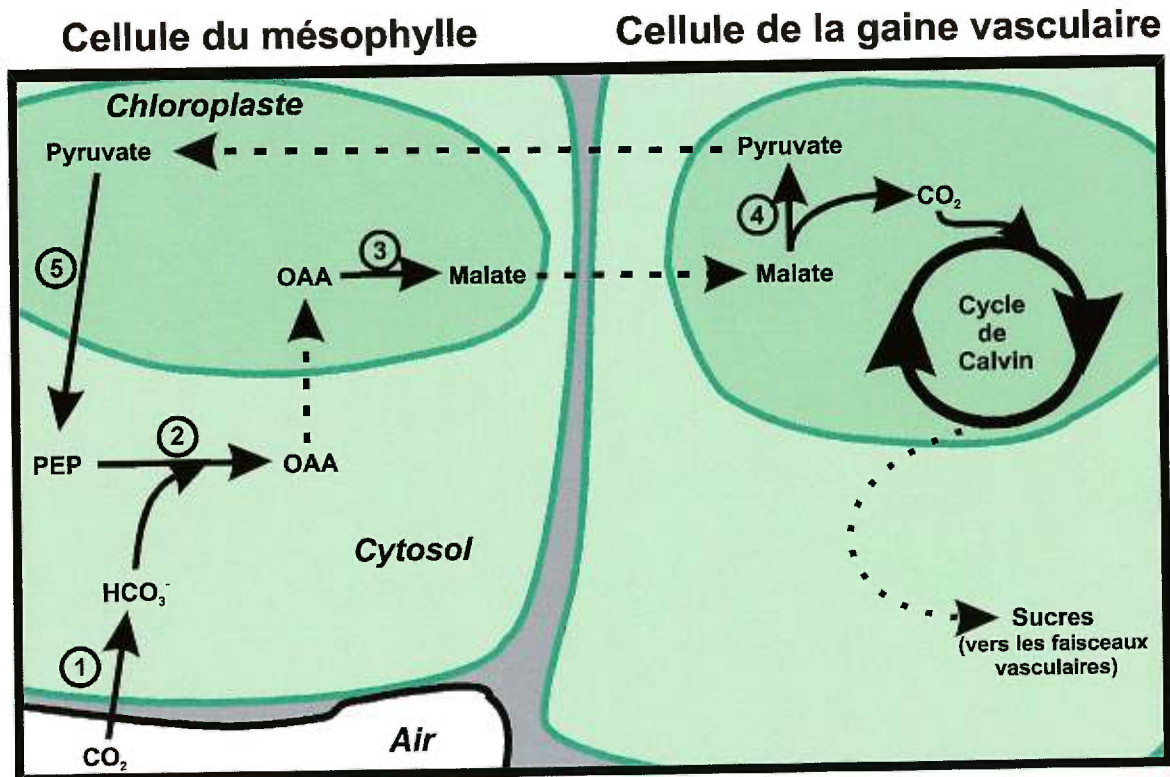


Figure III. Déroulement des réactions au cours du cycle dicarboxylique en C_4 de type NADP-ME. Enzymes prenant part aux réactions: ① anhydrase carbonique, ② phospho \acute{e} nylpyruvate carboxylase, ③ déshydrogénase malique NADP^+ -dépendante, ④ enzyme malique NADP -dépendante, ⑤ pyruvate orthophosphate dikinase. CO_2 dioxyde de carbone; HCO_3^- bicarbonate; OAA oxaloacétate; PEP phospho \acute{e} nylpyruvate.

Dans le deuxième groupe de plantes C₄, le type NAD-ME, l'aspartate joue le rôle de métabolite de transport du CO₂. L'aspartate prend naissance dans le cytosol du mésophylle suite à l'ajout d'un groupement amine sur l'OAA par l'aspartate aminotransférase. Après avoir été transporté dans les cellules de la GP, l'aspartate sera converti en malate et l'enzyme malate déshydrogénase NAD-spécifique décomposera le malate en CO₂ et en pyruvate. Ce dernier devra être aminé en alanine afin de retourner dans le mésophylle. Le cycle se terminera par la reconversion de l'alanine en pyruvate et sa phosphorylation en PEP.

Le troisième groupe utilise aussi l'aspartate comme métabolite de transport du CO₂. La différence survient dans la GP, où l'aspartate est reconverti en OAA. C'est la phospho~~éno~~pyruvate carboxykinase (PEPCK) qui décarboxyle l'OAA. Tandis que le CO₂ entre dans le cycle de Calvin, de l'alanine est vraisemblablement formé à partir du PEP restant. Elle est désaminée en pyruvate, qui est transporté dans le mésophylle et transformé en PEP, fermant ainsi le cycle.

L'espèce analysée dans cette étude, *Echinochloa crus-galli* appartient au premier sous-groupe. Ce sous-groupe se montre le plus sensible aux basses températures (Long 1983). Il est bien connu que le système photosynthétique de type C₄ s'avère plus efficace et avantageux dans des conditions de hautes températures et de fortes intensités lumineuses (Long 1983; Öquist 1983). La sensibilité accrue de la voie de photosynthèse en C₄ aux basses températures serait en partie occasionnée par la présence supplémentaire de sites d'inhibition. En effet, les deux types de cellules du cycle (mésophylle et GP) ainsi que le rallongement du cycle augmente le nombre de sites potentiels d'inhibition (Long 1983).

Toutes les plantes de types C₄ sont avantagées par rapport aux plantes C₃ sous des conditions de basses concentrations atmosphériques de CO₂. L'évolution des plantes C₄ se serait justement produite, à partir de la voie C₃, il y a environ 6 à 8 millions d'années à une période où la concentration de CO₂ aurait diminué considérablement.

L'analyse du rapport des carbones isotopiques ^{13}C et ^{12}C ($\delta^{13}\text{C}$) se veut un outil efficace pour aider à distinguer les voies photosynthétiques et en analyser son évolution temporelle. En effet, afin de mettre en évidence la voie en C_4 , l'une des méthodes utilisées consiste en la répartition des isotopes naturels du carbone ^{13}C et ^{12}C dans les produits de la fixation du carbone des sédiments et fossiles végétaux. Lors de la réaction de carboxylation initiale (via la PEPC chez les plantes C_4 et CAM et via la Rubisco chez les plantes C_3) les deux isotopes sont discriminés. La PEPC, moins sélective, utilise comme substrat un peu plus de $^{13}\text{CO}_2$ que la RUBISCO. Les espèces C_4 ont une valeur du $\delta^{13}\text{C}$ autour de -13‰ et les espèces en C_3 ont un taux plus bas autour de -27‰ (Richter 1993; Ehleringer & Monson 1993). Les données paléocarbonates et l'étude des fossiles indiquent une apparition soudaine de la biomasse C_4 en Amérique du Nord et du Sud, au sud de l'Asie et en Afrique dans des périodes relativement récentes, il y a environ 6 à 8 millions d'années (Ehleringer *et al.* 1991, Ehleringer *et al.* 1997).

1.5 RÔLE ET PROPRIÉTÉS DE LA PEPC

La phosphoéno/pyruvate carboxylase (PEPC; EC.4.1.1.31) est une enzyme ubiquiste chez les algues, les bactéries, les cyanobactéries et les plantes supérieures. Elle se retrouve dans le cytosol des tissus photosynthétiques et non-photosynthétiques de ces organismes (Lepinec *et al.* 1994; Toh *et al.* 1994; Chollet *et al.* 1996). Jusqu'à maintenant sa présence n'a toujours pas été détectée chez les animaux, les levures et les champignons (O'Leary 1982, Lepinec *et al.* 1994; Chollet *et al.* 1996).

Chez les plantes de type C_4 et CAM, la PEPC catalyse l'étape initiale de fixation du carbone. Cette enzyme entraîne la 2-carboxylation du PEP en présence de bicarbonate (HCO_3^-) et de Mg^{2+} (Mn^{2+}) pour produire de l'OAA et du P_i . L'ensemble de la réaction se déroule en deux étapes; en premier lieu, il se produit une formation (réversible) de carboxyphosphate et l'ajout d'un groupement énol au pyruvate. Cette étape est suivie de la carboxylation (irréversible) du pyruvate (Lepinec *et al.* 1994).

En plus de son rôle clé dans la photosynthèse en C_4 et dans le métabolisme acide des Crassulacées, la PEPC possède des fonctions anaplérotiques dans une variété de systèmes non-photosynthétiques. Par exemple elle intervient dans le cycle de l'acide citrique (cycle de Krebs) pour la synthèse et le réapprovisionnement d'intermédiaires du cycle (i.e. OAA et malate), procurant ainsi le squelette de carbone nécessaire à l'assimilation de l'azote et la biosynthèse des acides aminés (Lepiniec *et al.* 1994). Elle est impliquée dans les réactions anaplérotiques de partition du C/N dans les feuilles d'espèces C_3 , dans la formation et la germination des graines et dans la maturation des fruits (Lepiniec *et al.* 1994, Chollet *et al.* 1996). Elle joue un rôle dans le maintien du pH et de l'équilibre ionique et de la recapture du CO_2 dégagé lors de la respiration (Lepiniec *et al.* 1993). Des isoformes non-photosynthétiques de la PEPC jouent aussi un rôle durant l'ouverture des stomates (Chollet *et al.* 1996). Il faut souligner cependant que les propriétés cinétiques de la PEPC du cycle C_4 diffèrent de celles des PEPC trouvées dans les tissus non-photosynthétiques des espèces C_4 et dans tous les tissus des espèces C_3 (Ting & Osmond 1973).

Il existe différents allozymes de la PEPC chez les espèces C_3 , C_4 et CAM ayant chacun leurs propriétés distinctes. Parmi les plantes C_4 , la structure de l'enzyme varie d'une espèce à l'autre. Le poids moléculaire varie entre 180 000 daltons et 400 000 daltons (Maruyama *et al.* 1966; Mizioroko *et al.* 1974; Jones *et al.* 1978; O'Leary 1982; Barkrim *et al.* 1992; Relle & Wild 1996) et le nombre de sous-unités peut-être de 2 ou de 4. Chez *Zea mays*, graminée de type NADP-ME, la PEPC est une enzyme homotétramérique ayant un poids moléculaire de 400 000 daltons (O'Leary 1982).

Protéine importante, la PEPC représente près de 15% des protéines solubles des feuilles chez le maïs (O'Leary 1982). Malgré le fait que la phosphoéno/pyruvate carboxylase est classée comme une enzyme de régulation, surtout à cause de son potentiel pour la régulation allostérique (O'Leary 1982; Chollet *et al.* 1996), elle n'est pas considérée comme une enzyme limitante de la voie en C_4 (Long 1983). Les études antérieures ont démontré que chez *Echinochloa crus-galli* ainsi que chez trois autres espèces en C_4 (*Zea mays*,

Sorghum bicolor et *Spartina anglica*) l'activité de la PEPC est toujours en excès par rapport à la quantité requise pour l'assimilation du CO₂ (Long 1983; Simon *et al.* 1984b; Potvin & Simon 1990).

Plusieurs études ont démontré que la PEPC requiert la présence d'un cation divalent pour son activation. Le Mg²⁺ est le cofacteur présumé bien que d'autres ions métalliques activent aussi l'enzyme (Mn²⁺, Ni²⁺, Co²⁺, Zn²⁺ and Hg²⁺). Le Ca²⁺ est quant à lui un inhibiteur. La PEPC est sensible à plusieurs facteurs allostériques. Les sucres-phosphates (glucose-6-phosphate (G-6P), fructose-1,6-bisphosphate (FBP), triose-phosphate) activent la PEPC. Le L-malate, l'oxaloacétate, l'aspartate et les autres acides citriques sont des inhibiteurs de la PEPC. L'enzyme montre un maximum d'activité à un pH entre 7,5 et 8,5. (O'Leary 1982; Ausenhus & O'Leary, 1992; Lepinec *et al.* 1994; Chollet *et al.* 1996).

La PEPC des espèces C₄ est aussi sujette à une régulation lumière/noirceur qui affecte sa sensibilité vis-à-vis certains de ses effecteurs. En effet, Slack (1968) a observé que la PEPC extraite de feuilles d'*Amaranthus palmeri* éclairées avait une activité deux fois supérieure à celle extraite de feuilles conservées à la noirceur. Cet argument concernant l'effet de la lumière sur l'activité de la PEPC fut confirmé chez une autre espèce C₄, *Atriplex tatarica* (Gavalas *et al.* 1981). Les études effectuées depuis la fin des années 1980 sur la PEPC des plantes C₄ démontrent qu'il existe deux formes régulatrices de la PEPC, qui apparaissent dans les feuilles de maïs illuminées ou dans celles recueillies à la noirceur. Ces deux formes de PEPC montrent des différences dans leurs propriétés enzymatiques (Ashton *et al.* 1990). Ainsi l'activité spécifique de l'enzyme "lumière" est de 1,4 à 2,3 fois celle de la forme "obscurité" et sous certaines conditions, la forme "lumière" est moins sensible à une rétroinhibition du L-malate que l'autre forme (Gupta *et al.* 1994). De plus, la forme lumière serait plus sensible à l'effet du glucose-6-phosphate, un des principaux effecteurs positifs (Huber & Sugiyama 1986). Ces différences seraient dues à une régulation post-traductionnelle déterminée par la lumière (Jiao & Chollet 1988; Gupta *et al.* 1994).

Des études suggèrent que la PEPC peut être altérée par protéolyse lors de sa purification. McNaughton *et al.* (1989) rapportent que la forme protéolysée de la PEPC du maïs perd un fragment peptidique de 4 Kda à son extrémité N-terminus. Cette perte diminue la phosphorylation *in vitro* ainsi que la sensibilité de la PEPC à son effecteur allostérique négatif le L-malate (Ausenhuis & O'Leary 1992; Chollet *et al.* 1996). Cette modification ne semble pas avoir d'influence sur la mobilité électrophorétique de l'enzyme, sur son V_{max} et sur les propriétés cinétiques et thermiques connexes. L'intégrité de l'enzyme peut être préservée lors de son isolation par l'ajout de glycérol, de L-malate et de certains inhibiteurs de protéinase (spécialement la chymostatine) (Arrio-Dupont *et al.* 1992). En général, l'extrémité C-terminus contient la plupart des sites actifs importants et le côté N-terminus semble inclure les sites de régulation de l'enzyme (Chollet *et al.* 1996).

En accord avec la diversité des fonctions de l'enzyme, la PEPC végétale est codée par une petite famille multigénique à l'intérieure de laquelle chaque membre est contrôlé individuellement par des stimuli exogènes (lumière, environnemental) et/ou endogènes (hormonal et développemental). Chez *Sorghum*, trois gènes nucléaires de PEPC ont été rapportés. La famille du maïs possède au moins cinq gènes qui peuvent être classés en trois groupes distincts. Le gène pour la PEPC du cycle C₄ est unique et est situé sur le chromosome 9, près du centromère (Chollet *et al.* 1996). Pour ce qui est de la protéine PEPC, extraite du maïs, elle est composée de 970 acides aminés, comparé à 952 pour le sorgho, 966 pour *Flaveria trinervia* et 883 pour *E. coli* (Rajagopalan *et al.* 1994; Lepinec *et al.* 1994).

Chapitre II

Matériel et méthodes

La croissance rapide et facile d'*Echinochloa crus-galli* sous conditions contrôlées, sa distribution mondiale, son cycle de vie et ses particularités écologiques et physiologiques font de cette espèce un sujet expérimental idéal pour des études d'adaptation et d'acclimatation thermique.

2.1 CONDITION DE CROISSANCE

Des graines (caryopses) d'*Echinochloa crus-galli* ont été récoltées dans deux localités d'Amérique du Nord, soit à Sainte-Anne de Bellevue dans la province de Québec, Canada (QUÉ; Lat. 45°35' N, Long. 75°50'O) et à Leland dans l'État du Mississippi, U.S.A. (MISS; Lat. 33°20' N, Long. 90°75' O) (voir figure I pour l'aspect général des plantes et figure II pour les températures moyennes minimum et maximum des lieux d'origine des populations) (Simon *et al.* 1984a; Potvin *et al.* 1986; Potvin & Simon 1990).

Les graines ont germé dans des pots de 10 cm de diamètre contenant un mélange terreau-sable-vermiculite (2:1:1, v:v) dans des chambres de croissance (Modèle E7, Conviron, Winnipeg, MB, Canada). Les plantes ont poussé durant 5 semaines à une température de 26°/20°C (jour/nuit) à une photopériode constante de 16 heures. Ce régime de température de croissance 26°/20°a été sélectionné préalablement parmi d'autres combinaisons car il favorise la croissance optimale des deux populations d'*Echinochloa* (Potvin & Simon 1990). L'humidité relative à l'intérieur des chambres était maintenue à 70% et l'intensité lumineuse était d'environ 690 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (radiation photosynthétique active) au sommet des plantes. Les plants étaient arrosés régulièrement et fertilisés une fois par semaine avec de l'engrais soluble 20:20:20 N:P:K, à raison de 5g dans 1000 ml d'eau.

2.2 EXTRACTION ENZYMATIQUE ET PRÉPARATION DES EXTRAITS CRUS

Pour les analyses de l'activité de l'enzyme crue PEPC, 5 grammes de feuilles de plantes âgées de cinq semaines étaient recueillis vers 9 heures (soit 2 heures après illumination) et rapidement broyés à 4°C dans un homogénéisateur (Modèle MM-IB, Lourdes Vernitron Medical Products Inc.) avec 0,5g de PVPP insoluble, 4,5mg de DTT 10mM et 20ml de solution tampon d'extraction HEPES-KOH composée de 4(2-hydroxyméthyl)-1-pipérazine acide éthanesulphonique (HEPES)-KOH 50mM (pH 7,2), de chlorure de magnésium ($MgCl_2$) 5mM, d'acide éthylènediaminetétraacétique (EDTA)-4XNa 1mM, d'iso-ascorbate 0,5% (p/v) (modifiée de Edwards *et al.* 1982). Une fois homogénéisé, l'extrait est filtré à travers une double couche de Miracloth et centrifugé à 23 000 g durant 10 minutes à 2°C, dans une centrifugeuse à grande vitesse (Sorvall Centrifuge, modèle RC 5C, Sorvall Inc. Wilmington, Del. U.S.A.). Le surnageant était ensuite passé dans des colonnes de Séphadex G-25 (10cm x 1cm) préalablement équilibrées avec la solution d'extraction et les colonnes étaient ensuite centrifugées à 3 000g pendant 2 minutes à température de la pièce. Le passage de l'extrait dans un petit volume de Séphadex G-25 permet d'enlever les composés de faible poids moléculaire. Un aliquot de 0,5 ml du filtrat initial était collecté pour un dosage de chlorophylle. Les extraits étaient ensuite conservés au froid (2° à 4°C) afin d'éviter une dénaturation et utilisés à l'intérieur d'un délai de 4 heures. Des essais effectués sur différents laps de temps ont démontré qu'il n'y avait pas de perte d'activité au court de cette période de 4 heures entre l'extraction et les analyses.

La conservation de l'extrait cru au froid est essentielle afin de prévenir les réactions d'oxydations qui pourraient affecter l'enzyme. L'ajout d'agents protecteurs tels le PVP, l'EDTA-4XNa et le DTT est aussi une mesure de prévention visant à conserver l'activité de l'enzyme. Durant l'extraction, le bris des cellules entraîne par le fait même la perte de la compartimentation intra-cellulaire. La rencontre de certains composés tels les phénols (vacuole) et les phénolases (cytoplasme) est ainsi provoquée. L'oxydation des phénols par les phénolases produit des agents

oxydants qui peuvent altérer les protéines en formant des liens covalents avec les groupements amine, α -amine, imino et thiol. Sous certaines conditions, la PEPC est susceptible d'être inactivée par les agents formant des liaisons avec les thiols. Le rôle du PVP comme agent de protection est de fixer certains composés phénoliques et d'inhiber les phénolases. Le DTT a aussi un effet inhibiteur auprès des phénolases et il aide à maintenir les groupements -SH sous leur forme réduite, empêchant ainsi une perte d'activité. L'EDTA-4XNa étant un agent chélateur, il permet de minimiser l'inhibition des enzymes par les ions métalliques (Rhodes 1977).

2.3 EXTRACTION ENZYMATIQUE ET PURIFICATION PARTIELLE ET COMPLÈTE (modifiée de la méthode de Ashton *et al.* 1990)

Chacune des étapes de la procédure de purification s'est déroulée à une température oscillant entre 0° et 4 °C à l'exception de la chromatographie d'échange d'ion et les étapes subséquentes qui se sont déroulées à température de la pièce (20-22°C).

L'extrait partiellement purifié s'obtient par centrifugation différentielle avec du polyéthylène glycol (PEG). Lors de la phase initiale de cette procédure nous avons recueilli cinquante grammes de feuilles de plantes âgées de 5 semaines et ce, vers 9 heures du matin suite à une période d'illumination de 2 heures. Les feuilles sont ensuite coupées en petits morceaux et broyées dans un malaxeur de marque Général Électric dans 200ml de solution d'extraction HEPES KOH (pH 7,2) avec ajout de 5g de PVPP et 180mg de DTT durant cinq périodes de 10 secondes entrecoupées de cinq périodes de repos. Par la suite, l'homogénat est filtré à travers une double couche de Miracloth et centrifugé durant 20 minutes à 23 000g. Le surnageant est recueilli et il y a ajout de polyéthylène glycol solide d'un poids moléculaire de 8000 (PEG) 7% p/v suivi de 45 minutes de brassage. Ce mélange est ensuite centrifugé de nouveau à 23 000g durant 20 minutes et le surnageant est fractionné par ajout de PEG solide (concentration finale de 13% p/v). La protéine PEPC précipite entre 7% et 13% p/v de PEG. Suite à une

troisième centrifugation de 20 minutes, l'enzyme précipite dans le culot. Par cette méthode, plusieurs protéines précipitent dans le premier 7% de PEG, incluant la PPK. L'activité résiduelle du surnageant est testée et le culot est suspendu dans 10ml de solution 25mM HEPES-KOH (pH 7,2) contenant 5mM de $MgCl_2$, 5mM de DTT et 1mM EDTA-4xNa, avant d'être centrifugé 10 minute à 23 000g. De cet extrait partiellement purifié (PEG 13%) 5ml sont recueillis et dilués avec du glycérol 50% (v/v) et conservés à $-20^{\circ}C$. L'enzyme peut être ainsi conservée au moins pendant deux mois sans qu'il y ait perte d'activité.

Pour obtenir un extrait purifié, 5ml de l'extrait obtenu précédemment sont appliqués sur une colonne de chromatographie par échange d'ion diéthylamine éthyl cellulose (DEAE)-Sépharose CL-6B (Pharmacia, Uppsala, Suède) préalablement équilibré avec la solution d'extraction HEPES-KOH 50mM (pH 7,2). La colonne est ensuite lavée avec un gradient linéaire de KCL (0,05M à 4,0M) préparé à partir de 500ml de solution d'extraction HEPES. La colonne Pharmacia (modèle K 16-100) avec réservoir supérieur d'échantillon et adaptateurs de flow A-16 est reliée à une pompe péristaltique Manostat (modèle Cassette pump Junior). Le système parcourt la colonne avec un débit de 0,5 à 0,6 ml par minute avec un roulement des tubes s'effectuant chaque 2 ml recueillis à l'aide d'un collecteur de fraction (modèle 1200 ISCO), le tout est maintenu à la température de la pièce. L'activité des tubes est testée séparément. Un volume entre 58 ml et 76 ml, dépourvu d'activité, est recueilli avant que l'enzyme ne sorte de la colonne. Les fractions les plus actives sont recueillies autour des tubes # 29-30 et # 36-38 et sont conservées dans 50% (v/v) de glycérol à $-20^{\circ}C$.

2.4 ÉTUDE DES PROPRIÉTÉS PHYSIQUES DE LA STRUCTURE MOLÉCULAIRE

Le poids moléculaire de l'enzyme purifiée était obtenu suite à une électrophorèse sur gel à gradient d'acrylamide 4-20%. Vingt μ l d'extrait enzymatique purifié (MISS 5,39 μ g protéine; QUÉ 5,89 μ g protéine) des deux populations ont été placés dans les puits d'un gel "Ready gels for polyacrylamide

gel électrophorèse" de BIO-RAD et l'électrophorèse était réalisée à l'aide d'un appareil d'électrophorèse BIO-RAD (« mini protean II cell »). À des fins de comparaison, nous avons analysé la PEPC de maïs purifiée (SIGMA chemical company, St-Louis, MO.) dont le poids moléculaire est de 400 kDa. Pour l'électrophorèse de l'enzyme non dénaturée extraite des deux populations, du β -mercaptoéthanol 1% était ajouté à l'enzyme et à l'électrolyte (Tris-base 15g/l et glycine 72g/l, pH 8,3) afin d'empêcher la formation d'agrégats. L'enzyme dénaturée est obtenue suite à l'addition de 1:1 (v:v) de SDS (10%) suivie d'une incubation à 95°C pour 4 minutes. Le SDS est un détergent qui déplie les protéines en éliminant la variation des charges entre les polypeptides leur donnant ainsi le même rapport charge/masse tout en dépliant les protéines leur donnant ainsi l'allure d'un ruban. Pour ces électrophorèses, la solution tampon du compartiment des électrodes était composée de Tris-base (60.55g/l), tricine (89.60g/l) et de SDS (5.0g/l). Pour les deux types d'électrophorèse, le courant était maintenu entre 3 et 5mA par gel durant 12h à 4°C.

Les gels étaient ensuite teints avec une solution eau déionisée-méthanol-acide acétique 50:40:10 (v:v) additionné de 5 g/l de Bleu de Coomassie. Après une nuit de coloration, les gels étaient rincés plusieurs fois avec une solution d'eau déionisée-méthanol-acide acétique 50:40:10 (v:v).

Des électrophorèses furent aussi réalisées d'après la méthode de Kärn *et al.* (1973) pour une teinture directe qui tient compte de l'activité de la PEPC. Des extraits non purifiés (Séphadex G-25) de PEPC de MISS et de QUÉ (20 μ l par échantillon, standardisé à 8 μ g de protéines par échantillon avec ajout de glycérol 1:1 v/v) étaient placés dans les fentes d'un gel vertical de polyacrylamide biphasique (2,5 mm d'épaisseur). Ce gel est composé d'un gel de séparation de 5% d'acrylamide préparé avec un tampon Tris-HCl 0,5M (pH 8,9), superposé d'un gel de compactation de 4% d'acrylamide préparé avec un tampon Tris-HCl 0,1M (pH 6,7) (Simon 1986). Une solution Tris-glycine 0,04M, pH 8,3) était utilisée comme tampon pour remplir les deux compartiments des électrodes d'un appareil vertical d'électrophorèse pour plaques de gels d'acrylamide tel que décrit par

Chapel *et al.* (1974). L'électrophorèse était réalisée à une température de 2-4 °C pendant 3 heures à un courant constant de 25mA. Les gels étaient ensuite retirés de l'appareil et placés sur une plaque de teflon. Une teinture spécifique préparée d'après la technique de Kärn *et al.* (1973) (voir composition à l'annexe I) était mélangée dans une proportion de 1:1 (v/v) avec une solution de 1% d'amidon soluble maintenue liquide à 65°C et ce mélange était immédiatement étendu sur le gel d'acrylamide où il se solidifiait en se refroidissant. Cette réaction de couplage permet de détecter l'activité de la PEPC par le développement graduel d'une zone de couleur rouge-mauve dans la partie du gel d'acrylamide où il y a formation d'oxaloacétate produite par la catalyse de l'enzyme. Le développement maximal de cette teinture de couplage était complété dans les 30 minutes qui suivaient l'application. Le gel immergé dans l'eau était photographié immédiatement par transillumination diffuse avec un film technical Pan Estar-AH base.

Des électrophorèses en deux dimensions furent aussi réalisées pour voir si la PEPC des deux populations présentait des différences au niveau de leur point isoélectrique. L'électrophorèse en deux dimensions se base sur la technique développée par O'Farrell (1975) et comporte une première séparation sur bande verticale IPG («immobilized pH gradient») suivi d'une seconde séparation horizontale sur gel SDS. La première dimension permet de séparer la protéine d'après son point isoélectrique. Cette séparation se fait grâce à un gradient de pH établi par les deux électrolytes ayant un pH fixé (IPG). La seconde dimension, SDS, sépare les protéines d'après leurs poids moléculaires.

L'électrophorèse fut réalisée sur des gels de 4% d'acrylamide à l'aide d'un BIO-RAD modèle « mini-protean II 2-D cell ». Les gels en formes de boudins se composent de 9.2M urée, 4% acrylamide, de 20% Triton X-100, 1,6% ampholyte Bio-Lyte 5/7, de 0.4% ampholyte Bio-Lyte 3/10, de 0,01% de persulfate d'ammonium (APS) et de 0,1% TEMED. Des aliquots de 20 µl de chaque enzyme (MISS 5,39 µg protéines; QUÉ 5,89 µg protéines; *Zea mays* 5,23 µg protéine) sont déposés à l'extrémité supérieure de chaque boudins et deux solutions tampons ayant des pH différents sont placées dans les deux chambres de l'appareil. Le

tampon de la chambre inférieure est constitué de 10mM H₃PO₄ (pH 3) et celui de la chambre supérieure de 120mM NaOH (pH 12). Le courant circule durant 10 min à 500 V et est ensuite augmenté à 750 V pour une durée de 3.5 heures, à 4°C. Les boudins sont alors éjectés de leur tube et conservés à -80°C dans quelques ml de solution tampon de Laemmli (1970): Tris-base (15g/l), de glycine (72g/l) et de SDS (5g/l).

Pour la seconde dimension, chaque boudin est placé sur un gel d'acrylamide et la migration se fait à l'aide du BIO-RAD modèle « mini protean II cell ». Le gel de compactage contenait 4,67 % d'acrylamide préparé dans un tampon Tris-HCl 0,5mM (pH 6,8) contenant aussi du SDS (10%) et le gel de séparation à 8% d'acrylamide dissout dans un tampon Tris-HCl 1,5 mM (pH 8.8).

La solution tampon du compartiment des électrodes était constituée de Tris-base (15g/l), de glycine (72g/l) et de SDS (5g/l). Un courant initial de 250 V était établi jusqu'à ce que les extraits aient pénétré dans le gel de compactage. Par la suite le courant était ajusté à 200 V jusqu'à ce que la migration soit terminée. La durée de l'électrophorèse est de 60 minutes à 4°C.

Les gels sont ensuite retirés et teints 2 heures dans une solution de bleu de Coomassie et rincés plusieurs fois avec une solution d'eau déionisée-méthanol-acide acétique 50:40:10: (v:v).

Dû aux résultats ambiguës des électrophorèses en deux dimensions (voir résultats) des électrophorèses sur gel à gradient de pH furent réalisées à l'aide de gels spécifiques pour la détermination du pI récemment mis en marché par BIO-RAD. Cette technique fut réalisée sur des gels de 5% d'acrylamide (« IEF ready gels for pI determination » de BIO-RAD) à l'aide d'un appareil d'électrophorèse BIO-RAD (« mini protean II cell »). Ces gels contiennent des « BIO-RAD's BIO-lyte ampholytes », des molécules amphotériques qui créent un gradient de pH à l'intérieur des gels. La technique se base sur une séparation sur bande verticale IPG (« immobilized pH gradient ») qui permet de séparer les protéines d'après leur charge nette. Les protéines sont ainsi immobilisées à l'endroit où le pH du gel

correspond à une charge nette de zéro (pI). Des marqueurs IEF(BIO-RAD) ayant des pI entre 4,45 et 9,6 sont utilisés à des fins de comparaisons.

Des aliquots de 20 μ l de chaque enzyme non dénaturée (QUÉ 5,89 μ g/ml protéines; MISS 5,39 μ g/ml protéine et *Zea mays* 5,23 μ g/ml) étaient déposés dans les puits et deux solutions tampons différentes furent placées dans les deux compartiments de l'appareil. Le tampon de la chambre inférieure était constitué de 10mM H₃PO₄ (pH 3) et celui de la chambre supérieure de 100mM NaOH (pH 12). Le courant circulait durant 60 min à 200 V à 4°C.

Les gels furent ensuite retirés et teints 2 heures dans une solution de bleu de Coomassie et rincés plusieurs fois avec une solution d'eau déionisée-méthanol-acide acétique 50:40:10: (v:v).

2.5 CHLOROPHYLLE ET PROTÉINES

Les concentrations de chlorophylle totale (a et b) et de protéines ont été déterminées à partir des extraits préparés pour les mesures d'activités enzymatiques. La chlorophylle a été dosée suivant la méthode de Bruinsma (1963). Les échantillons étaient prélevés avant la première centrifugation et conservés à -20°C jusqu'à l'analyse. 120 μ l d'extrait est additionné à de l'éthanol jusqu'à l'obtention d'une concentration finale de 96% d'éthanol. Le mélange était par la suite agité et incubé pendant plus d'une heure à température de la pièce et à l'obscurité. Après une centrifugation de trois minutes à 670g, l'absorbance était mesurée à des longueurs d'onde de 649 et 665 nm à l'aide d'un spectrophotomètre Novaspec (modèle LKB-4049). Cette méthode permettait de calculer la quantité de chlorophylle a et b ainsi que leur sommation, à partir des densités optiques des extraits. La mesure était exprimée en milligrammes de chlorophylle totale par gramme de feuille (poids frais).

La quantité de protéines solubles contenue dans les feuilles a été déterminée à partir d'échantillons crus, partiellement et totalement purifiés selon la

méthode de Bradford (1976). Les protéines solubles étaient dosées par l'absorbance à 595 nm du mélange de 0.1ml d'échantillon et 0.9ml de réactif à l'aide d'un «BioRad Protein Assay» (BioRad Laboratories, Hercules, CA, É-U). Le réactif était composé de 100 mg de Bleu brillant de Coomassie, 50 ml de méthanol, 100 ml d'acide phosphorique (85%) et de l'eau déionisée pour un volume final de 200 ml. Une courbe de calibration fut établie avec des concentrations connues de sérum d'albumine bovine. La mesure fut exprimée en µg de protéines par ml.

2.6 ANALYSES SPECTROPHOTOMÉTRIQUES

L'activité enzymatique des différents extraits fut analysée par spectrophotométrie à 340 nm, en suivant l'oxidation progressive du coenzyme NADH en NAD⁺ à l'aide d'un spectrophotomètre digital à flot continu (Baush & Lomb, modèle DP-100) rattaché à un enregistreur automatique programmable (Baush & Lomb, modèle D400/D100, Rochester, NY). La température des essais était maintenue constante en couplant le spectrophotomètre à un bain à température contrôlé Lauda (modèle K2-RD, Königshofen, Allemagne). Les températures étaient contrôlées lors des essais par l'immersion d'un microthermomètre YSI relié à un téléthermomètre ISY modèle 47 (Yellow Springs Instruments Co. Inc., Yellow Springs, OHIO). Les lectures du spectrophotomètre étaient prises (avec un délai initial de 8 secondes afin d'assurer une linéarité de la réaction) à intervalles de 5 secondes pendant 30 secondes

2.6.1 ACTIVITÉ SPÉCIFIQUE

L'activité spécifique de la PEPC était calculée à la température d'essai de 30°C, de la façon suivante :

différence de densité optique mesurée à 340 nm sur 1 min x coefficient d'extinction ($6,2 \cdot 10^{-3}$) x 1/volume (µl) x 1/protéine (µg) x min.

2.6.2 THERMODÉNATURATION À HAUTE TEMPÉRATURE

La thermodénaturation de la PEPc fut mesurée à 48 °C à partir de 0,5 ml des différents extraits incubés dans un bain Lauda (modèle K4RD Konigshofen, Germany (Montréal)) pour des périodes prédéterminées soit: 0 (témoin), 2, 4, 6, 8, 10, 15, 20 et 30 minutes. Des tests préliminaires à une température de 45°C n'avaient pas suffisamment dénaturé les extraits alors que des tests à des températures de 50° et 53° C étaient caractérisés par une dénaturation trop rapide pour fins d'analyse et d'interprétation. Les extraits étaient ensuite retirés et leur activité résiduelle était analysée immédiatement.

Des tubes à essais étaient incubés à 25 °C avec un volume final de 2,30 ml de solution tampon KOH 25 mM (pH 8,3) contenant du KHCO₃ (0,2g/l), 0,35 mM de NADH, 1 mM de Glucose-6-phosphate, 2,6 unités de MDH, 1mM de PEP (à moins de calculer les K_m), 5 mM de MgCl₂ (à moins de calculer les K_m), et du KOH afin d'ajuster le pH. Lors des essais au spectrophotomètre on ajoutait successivement chacun des échantillons dénaturés à différents temps.

La thermodénaturation était exprimée en fonction des pourcentages d'activité résiduelle après dénaturation de l'enzyme, et ce par rapport à l'activité du témoin. Ces résultats étaient représentés sur un graphique à échelle semi-logarithmique.

Les mesures de chaque essai représentent la moyenne de trois essais consécutifs. De plus, chaque groupe d'essais fut repris sur au moins trois autres échantillons indépendants provenant d'extractions différentes.

2.6.3 STABILITÉ AUX BASSES TEMPÉRATURES

Des aliquots de 0,5 ml d'enzyme étaient placés dans des microtubes et insérés dans un bain circulaire Lauda 2R maintenu à une température de 0°C pendant 0 (témoin), 5, 10, 20, 40 et 60 minutes. L'extrait enzymatique était ensuite ramené à 25 °C et l'activité résiduelle de l'enzyme suite aux différentes périodes de temps était analysée immédiatement.

2.6.4 ÉNERGIE D'ACTIVATION APPARENTE (E_A)

Les Q_{10} (coefficients thermiques) furent estimées sur des intervalles de températures variant de 15-5°C, 20-10°C, 25-15°C, 30-20°C, 35-25°C et 40-30°C. L'expérimentation se fait de la même façon que pour les mesures de K_m et de V_{max} , sauf que seules les valeurs obtenues pour une concentration du substrat PEP de 2mM et de 5mM de magnésium ont été retenues.

Les valeurs de Q_{10} furent calculées selon la formule suivante:

$$Q_{10} = \frac{\text{Vitesse } (T + 10) ^\circ\text{C}}{\text{Vitesse } (T) ^\circ\text{C}}$$

Les mesures d'énergies d'activation apparente furent calculées à partir des valeurs de Q_{10} obtenues, d'après la formule de Dixon et Webb (1979):

$$E_a \text{ (kJ/mol)} = RT^2 \ln Q_{10} / 10$$

Où

R = constante des gaz parfaits = 8.314 kJ.mol⁻¹.K⁻¹

T = température en degrés Kelvin

2.6. 5 CONSTANTE DE MICHAELIS-MENTEN (K_M) ET VITESSE MAXIMALE (V_{MAX})

La constante de Michaelis-Menten (K_m) détermine la concentration de substrat pour laquelle la vitesse de réaction est égale à la moitié de la vitesse maximale et ce, pour une température d'essai donnée. Le (K_m), le V_{max} , le rapport V_{max}/k_m furent estimés suivant les vitesses des réactions (aux huit températures d'essai) en fonction de chacune des concentrations du substrat (PEP) ou du co-facteur (Mg^{2+}) utilisées. Des concentrations de 0.0625mM, 0.125mM, 0.25mM, 0.5mM, 1mM et 2mM de PEP furent utilisées lors de l'analyse de l'affinité de l'enzyme pour son substrat, PEP. Pour l'analyse de l'affinité de l'enzyme pour le Mg^{2+} , les tubes à essais contenaient du $MgCl_2$ pour des concentrations finales de Mg^{2+} de 0.155mM, 0.31mM, 0.625mM, 1.25mM, 2.5mM et 5mM.

Tous les essais étaient effectués à des températures variant entre 5° C et 40° C pour les extraits partiellement et totalement purifiés et à des températures entre 10° et 40° C pour les extraits crus (modifié de Simon *et al.* 1984a.). Des analyses réalisées avec les extraits crus à une température de 5°C ont donné des résultats très instables, nous avons ainsi préféré ne pas prendre en considération cette température pour les extraits crus.

On mesure l'affinité de l'enzyme pour son substrat grâce à la courbe de Lineweaver-Burk ($1/V$ en fonction de $1/S$ où la pente = K_m/V) modifiée à l'ordinateur par la méthode de Wilkinson (1961) qui corrige et établit statistiquement la meilleure pente qui tient en considération les erreurs établies par les écarts des observations sur la pente. Ainsi, les K_m , les V_{max} et les rapports V_{max}/K_m furent calculés d'après la méthode statistique de Wilkinson qui permet d'obtenir leurs valeurs ainsi que celles de leurs écarts-types. Pour ce faire, nous avons utilisé le logiciel Wilman 4 (1985, Michigan State University) qui est basé sur la méthode de calcul de la régression linéaire de Wilkinson (1961).

2.6.6 INDICATEUR DU POUVOIR CATALYTIQUE (K_{CAT})

L'activité moléculaire de la PEPC (K_{cat}) fut déterminée à partir des valeurs découlant de l'activité enzymatique aux températures d'essais de 5°C à 40°C par paliers de 5°C, pour une concentration optimale de substrat de 2mM.

Le K_{cat} mesure le rapport entre le nombre de μ moles de NADH oxydé par seconde et le nombre de μ moles d'enzyme (PEPC) dans le système, d'après la méthode de Somero (1978) et Somero et Graves (1982). Ce paramètre représente ainsi le nombre de molécules de substrat dégradé par site actif de l'enzyme par unité de temps. Lors du calcul de ce rapport, on se réfère au poids moléculaire de la phosphoénolpyruvate carboxylase équivalant à 400 000 daltons. Les valeurs de K_{cat} sont exprimées par des unités de remplacement: sec^{-1} .

$$K_{cat} = V_{max} / \text{concentration de l'enzyme}$$

ou

$$K_{\text{cat}} = \text{Nombre de } \mu\text{moles de NADH oxydé par seconde} / \\ \mu\text{g protéine} \times (\text{poids moléculaire de l'enzyme})^{-1}$$

2.7 ANALYSES STATISTIQUES

Trois purifications indépendantes issues de séries d'extractions différentes ont été effectuées pour chaque population et ce, pour chaque niveau de purification (Séphadex G-25, PEG-13%, DEAE-sépharose). Chaque extrait était soumis à toutes les températures (sauf 5 C pour l'extrait cru) et à toutes les concentrations de PEP et de magnésium.   chaque essai, un minimum de trois réplicats du même extrait fut testé. Les données obtenues furent soumises à une analyse de variance à mesures répétées (ANOVAR) [Potvin *et al.* 1990]. ANOVAR nous permet de savoir si les différences entre les courbes obtenues pour les deux populations sont significatives ou non. Ce type d'analyse statistique est requis pour ce genre d'étude, lorsque les valeurs utilisées pour construire les courbes sont obtenues à partir d'un même extrait (i.e. ne sont pas indépendants). De plus, les ANOVAR nous renseignent sur les effets entre les sujets «between-subject effects» et sur les significations statistiques des interactions. ANOVAR nous permet de calculer à la fois les différences entre populations, entre les niveaux de purification et l'interaction populations x purifications.

Les différences sont dites non significatives lorsque $P > 0.05$, significatives lorsque $P < 0.05$, très significatives lorsque $P < 0.01$ et hautement significatives lorsque $P < 0.001$. Des tests d'analyse de variance (ANOVA) ont aussi été réalisés afin de nous permettre de déterminer si l'enzyme PEPC montrait des différences entre les deux populations et ce, pour chaque température d'essai. Pour les analyses statistiques des courbes de thermodénaturation   47 C, les valeurs des pourcentages d'activités résiduelles ont été transformées ($\arcsin\sqrt{P}$).

Les résultats des tests d'ANOVA sont conservés sur disquettes au laboratoire du Dr Simon et sont disponibles sur demande.

Chapitre III

Résultats

3.1 ÉLECTROPHORÈSE ET PURIFICATION DE LA PEPC

3.1.1 PURIFICATION DE LA PEPC

Comparativement aux extraits crus, les phospho eno /pyruvate carboxylase du Québec et du Mississippi sont purifiées d'un facteur de 10 et 6, respectivement, suite à la purification partielle par centrifugation différentielle avec du polyéthylène glycol. Suite à l'utilisation d'une colonne d'affinité DEAE-sépharose, nous avons obtenu des taux de purification de 134 et de 126 pour les PEPC extraites des populations QUÉ et MISS respectivement (Tableau 2).

Tableau 2. Étapes de la purification de la phospho eno /pyruvate carboxylase extraite de feuilles de deux populations d'*Echinochloa crus-galli*. Les valeurs représentent pour chaque population les moyennes de trois séries de purifications à partir d'extractions indépendantes.

Population	Étape de Purification	Activité totale ($\mu\text{mol}/\text{min}^{-1}$)	Protéines		Activité spécifique** ($\mu\text{mol}/(\text{mgP})^{-1}/\text{min}^{-1}$)	Recouvrement %	Taux de purification
			($\mu\text{g}/\text{ml}$)	(mg)			
QUÉ	Séphadex G-25	6,25	207,00	36,352	$0,172 \pm 0,02$	100,0	-
	PEG-13%	4,68	149,00	2,731	$1,712 \pm 0,12$	74,9	x 10
	DEAE-S	1,68	5,17	0,073	$23,001 \pm 8,33$	26,9	x 134
MISS	Séphadex G-25	3,47	132,00	23,284	$0,149 \pm 0,02$	100,0	-
	PEG-13%	2,72	92,50	3,072	$0,885 \pm 0,12$	78,4	x 6
	DEAE-S	1,06	4,17	0,056	$18,845 \pm 1,56$	30,5	x 127

3.1.2 POIDS MOLÉCULAIRE DE LA PEPC

L'électrophorèse de la PEPC obtenue de la colonne DEAE-sépharose CL-6 β montre pour chaque population, un seul isomorphe ayant la même mobilité électrophorétique sur le gel de polyacrylamide correspondant à un poids moléculaire de 400 kDa, et ce à la fois pour QUÉ et MISS (Figure IV). Le poids moléculaire obtenu pour l'enzyme d'*Echinochloa crus-galli* est similaire à celui de

l'enzyme non dénaturée du maïs qui est de 400 kDa (O'Leary 1982; Ashton *et al.* 1990). Les électrophorèses obtenues par la méthode de Kärn *et al.* (1973) nous indiquent que l'enzyme purifiée est bien la phosphoenolpyruvate carboxylase (Figure V).

Pour les enzymes dénaturées, le gel d'acrylamide ne révèle qu'une seule bande de mobilité identique chez les deux populations QUÉ et MISS. Le poids moléculaire est estimé à 100 kDa et est semblable au poids moléculaire de la phosphorylase β (97 Kda) un des marqueurs protéiques utilisés (Figure VI). Ce poids est aussi similaire à celui de la PEPC du maïs (100 kDa) (O'Leary 1982; Ashton *et al.* 1990). À titre de comparaison, des valeurs poids moléculaires rapportés pour la PEPC d'autres espèces sont présentées au tableau 3.

Tableau 3. Tableau comparatif des poids moléculaires de la PEPC d'*Echinochloa crus-galli* avec ceux d'autres espèces rapportées dans la littérature.

Source de la PEPC	Poids moléculaire (kDa)		Références
	Non dénaturée	Sous-unité	
Maïs (mésophylle) C ₄	400	100 (homotétramère)	O'Leary 1982
Sorgho (mésophylle) C ₄	440	110 (homotétramère)	Bakrim <i>et al.</i> 1992
<i>B. fedtschenkoi</i> (Crassulacée) CAM	400	100 (homotétramère)	Jones <i>et al.</i> 1978
Épinard (feuille) C ₃	-	130 (homotétramère)	Mizioroko <i>et al.</i> 1974
Arachides (cotylédons) C ₃	350	-	Maruyama <i>et al.</i> 1966
<i>Picea abies</i> , Gymnosperme	-	110 (homotétramère)	Relle & Wild 1996
<i>Rhodothermus obamensis</i> (bactérie)	400	100 (homotétramère)	Takai <i>et al.</i> 1997
<i>Echinochloa crus-galli</i> (feuille) C₄	400	100 (homotétramère)	Notre étude

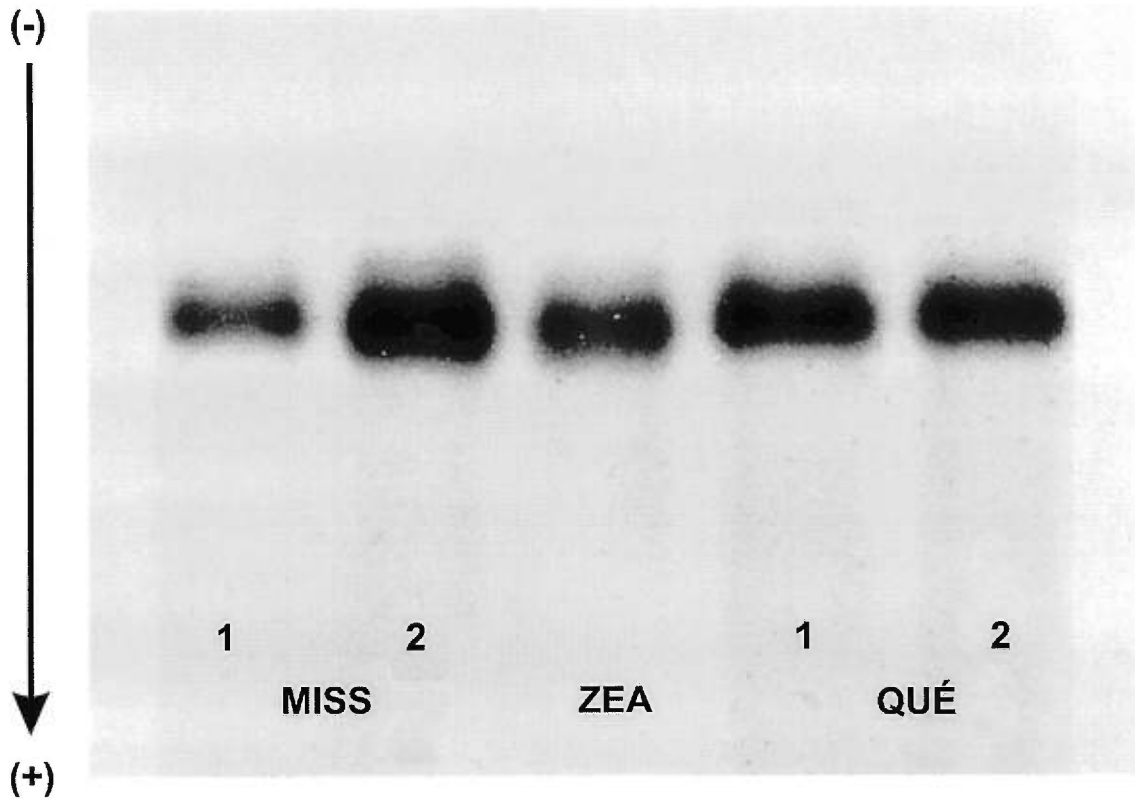


Figure IV. Photographie d'un gel d'acrylamide de la PEPC non dénaturée pour les deux populations QUÉ et MISS d'*Echinochloa crus-galli* comparée à la PEPC non dénaturée purifiée de *Zea mays* (400 kDa) provenant de SIGMA Chemical Company (St-Louis, MO). 20 μ l d'extrait sont ajoutés dans chaque puits (QUÉ 5,89 μ g protéine; MISS 5,39 μ g protéine; *Zea mays* 5,23 μ g protéine).

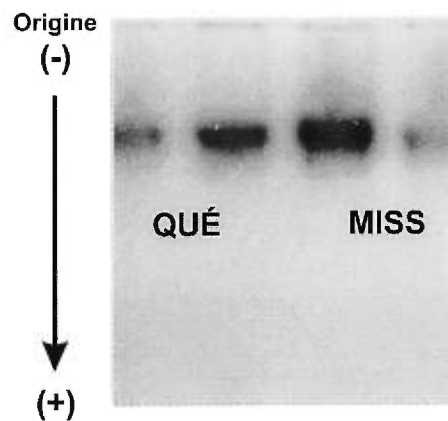


Figure V. Photographie du gel électrophorétique de séparation suite à l'ajout d'une teinture spécifique à la PEPC non dénaturée pour les deux populations QUÉ et MISS d'*Echinochloa crus-galli*. Selon la méthode de Kärn *et al.* (1973).

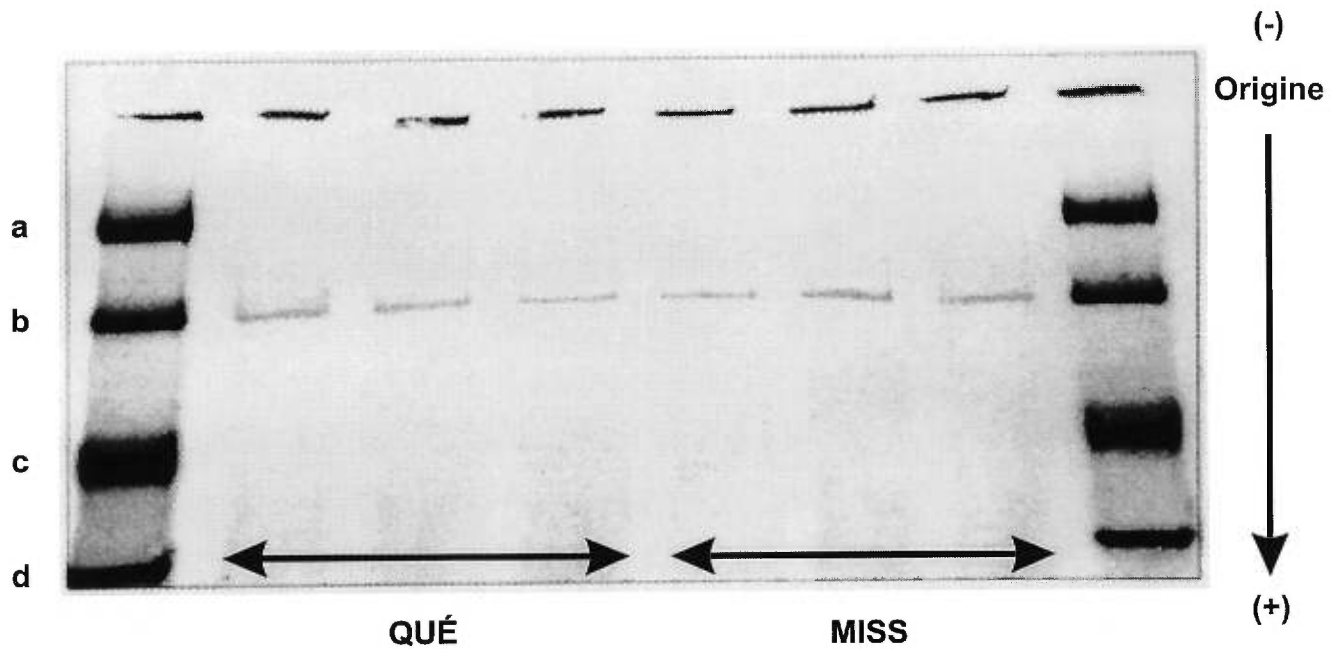


Figure VI. Photographie du gel d'acrylamide de la PEPC dénaturée (SDS) pour les deux populations QUÉ et MISS d'*Echinochloa crus-galli*. 20 μ l d'extrait ont été ajoutés dans chaque puits (QUÉ 5,89 μ g protéine; MISS 5,39 μ g protéine). Les marqueurs de bas poids moléculaires utilisés sont de la cathode (-) à anode (+): a) β -Galactoside (116 Kda), b) Phosphorylase β (97 Kda), c) Albumine de sérum de bovin (66 Kda), d) Fumarase (48.3 Kda).

3.1.3 POINT ISOÉLECTRIQUE DE LA PEPC

Les gels d'acrylamide en deux dimensions montrent une seule bande pour un mélange des extraits QUÉ, MISS et *Zea mays*. Cette bande est située à l'extrémité basique (cathode) du boudin d'acrylamide et ne semble pas avoir migré lors de la première dimension. Par contre la seconde dimension, après dénaturation au SDS, indique un poids moléculaire pour l'enzyme d'environ 100 kDa lorsqu'on le compare à ceux des marqueurs de poids moléculaire (Figure VII).

Les gels d'acrylamide pour la détermination du point isoélectrique (pI) montrent une seule bande d'activité à un pI identique pour les extraits QUÉ et MISS, ainsi que pour la PEPC purifiée de *Zea mays* (SIGMA Chemical Company, St-Louis, MO). Le pI de la PEPC est estimé à 4,95 et est situé entre le pI de la phycocyanine (4,75) et celui de la β -lactoglobuline B (5,1), deux des marqueurs utilisés (Figure VIII).

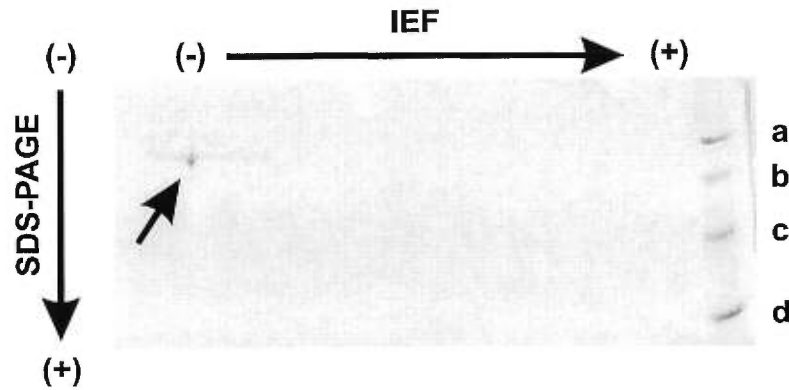


Figure VII. Photographie du gel en deux dimensions de la PEPC dénaturée d'un mélange des deux populations QUÉ et MISS d'*Echinochloa crus-galli*. Des gels réalisés avec un extrait de PEPC purifié *Zea mays* donnent un résultat identique. Les marqueurs de bas poids moléculaires utilisés lors de la dimension SDS-PAGE sont dans l'ordre de la cathode (-) à anode (+); a) Phosphorylase β (97,4 kDa), b) Albumine de sérum de bovin (66,2 kDa), c) Ovalbumine de blanc d'œuf de poule (45 kDa), d) Anhydrase carbonique de bovin (31 kDa).

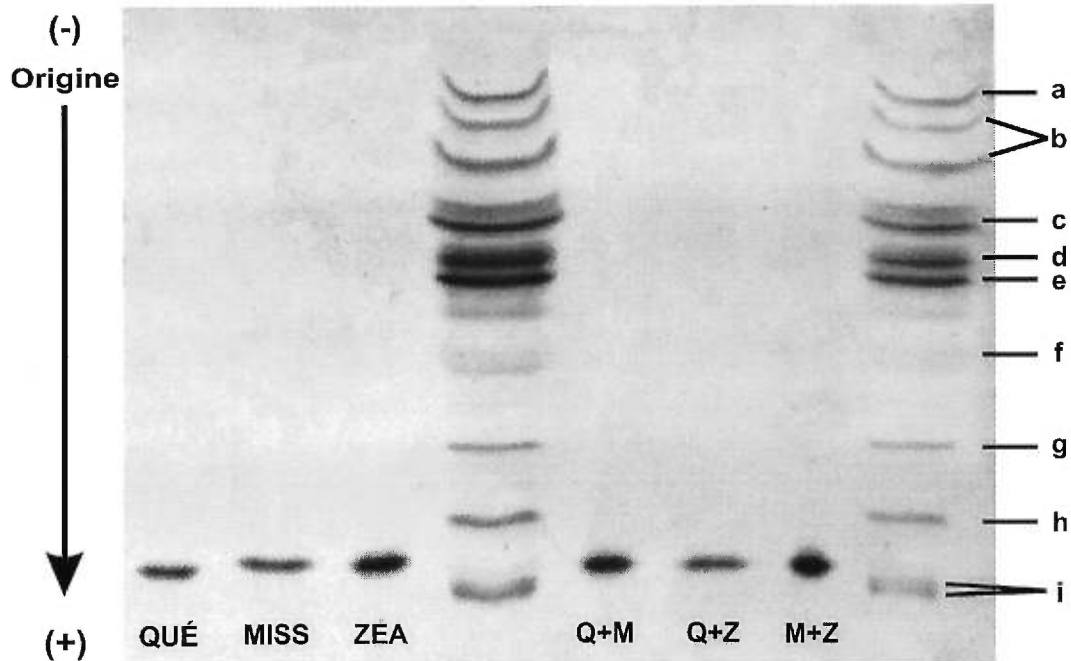


Figure VIII. Photographie d'un gel d'acrylamide à gradient de pH (3-10) pour la détermination du point isoélectrique de la PEPC non dénaturée pour les deux populations QUÉ (Q) et MISS (M) d'*Echinochloa crus-galli* comparé au point isoélectrique de PEPC non dénaturée purifiée de *Zea mays* (Z) (SIGMA Chemical Company, St-Louis, MO). À droite du gel, des mélanges sont appliquées en proportion 1:1 (v/v). Les marqueurs de pI utilisés sont de la cathode (-) à anode (+): a) Cytochrome c (pI 9,6), b) Lectine de lentille (3 bandes, pI 8,2; 8,0; 7,8), c) Hémoglobine humaine C (pI 7,5), d) Hémoglobine humaine A (pI 7,1), e) Myoglobine équine (2 bandes, pI 7,0; 6,8), f) Anhydrase carbonique humaine (pI 6,5), g) Anhydrase carbonique bovine (pI 6,0), h) β -Lactoglobuline B (pI 5,1) et i) Phycocyanine (3 bandes, pI 4,75; 4,65; 4,45).

La PEPC extraite et purifiée des deux populations étudiées est une enzyme homotétramérique ayant quatre sous-unités du même poids. Il n'a pas été possible de différencier les deux populations d'*Echinochloa crus-galli* par leur patron électrophorétique ni par leur point isoélectrique. La PEPC de QUÉ et MISS possède une mobilité électrophorétique identique à celle du maïs.

3.1.4 ACTIVITÉ SPÉCIFIQUE DE LA PEPC

Les valeurs de l'activité spécifique de la PEPC sont présentées au tableau 2. Les valeurs de l'activité spécifique (à 30°C) sont exprimées sur une base protéinique, en $\mu\text{mol (mg prot)}^{-1} \text{ min}^{-1}$. Bien que les valeurs des activités spécifiques de la PEPC du Québec sont plus élevées que celles du Mississippi pour tous les niveaux de purification, les ANOVA indiquent qu'il n'y a pas de différences significatives entre les populations pour les extraits crus et purifiés (Séphadex G-25: $F=1,01$, $P>0,05$ et DEAE-sépharose: $F=1,1957$, $P>0,05$). Par contre, on note des différences très significatives (PEG 13%: $F=24,07$, $P<0,01$) entre les extraits partiellement purifiés QUÉ et MISS, l'activité de l'enzyme de QUÉ étant le double de celle de MISS. Tels qu'attendu, les ANOVAR indiquent des différences hautement significatives entre les purifications ($F=112,96$; $P<0,001$).

3.1.5 DOSAGE DE PROTÉINES

Le contenu en protéines des extraits est présenté au tableau 2, et est exprimé en $\mu\text{g/ml}$. Les tests d'ANOVA indiquent des différences hautement significatives entre les purifications ($F=201,38$, $P<0,0001$). Pour tous les extraits, le contenu en protéine des plantes QUÉ est statistiquement supérieur à celui des plantes MISS (Séphadex G-25: $F= 45,46$, $P=0,025$; PEG 13%: $F=10,52$, $P=0,031$ et DEAE-sépharose: $F=9,31$, $P=0,038$).

3.1.6 DOSAGE DE LA CHLOROPHYLLE (TOTALE)

Le contenu en chlorophylle des plantes de la population du Québec est inférieur à celui des plantes du Mississippi. Les valeurs obtenues sont de $3,85 \pm 0,32$ mg/g de feuilles pour la population QUÉ et de $4,42 \pm 0,55$ mg/g de feuilles

pour la population MISS. Les analyses statistiques réalisées (ANOVA) n'indiquent pas de différences significatives entre les deux populations ($F= 0,85$; $P>0,05$).

3.2 PROPRIÉTÉS THERMIQUES DE LA PHOSPHOÉNOLPYRUVATE CARBOXYLASE.

3.2.1 THERMOSTABILITÉ À 47°C

Les courbes de thermostabilité exprimées en logarithme du pourcentage d'activité résiduelle en fonction de la durée de dénaturation 47°C sont présentées à la figure IX pour chacun des niveaux de purification de la PEPC des deux populations. Pour l'analyse statistique, les valeurs de pourcentage d'activité résiduelle ont été transformées ($\arcsin\sqrt{P}$). L'analyse de variance à mesures répétées (ANOVAR) des valeurs transformées de pourcentage d'activité résiduelle de la PEPC sont indiquées au tableau 4.

Les extraits enzymatiques crus et partiellement purifiés de MISS testés étaient significativement plus thermostables que ceux de QUÉ. Malgré l'absence de différences significatives entre les deux populations, l'extrait purifié (DEAE-sépharose) MISS tend vers une plus grande stabilité thermique que celui de QUÉ. La préparation la plus stable est celle de l'extrait partiellement purifié (PEG) MISS, qui conserve près de 59% d'activité résiduelle après 30 minutes. Par comparaison, l'extrait enzymatique partiellement purifié (PEG) QUÉ est le moins stable; après 30 minutes de dénaturation cet extrait ne conserve que 11% de son activité initiale. Alors que pour MISS l'extrait cru est le plus sensible des trois, pour QUÉ c'est l'extrait partiellement purifié qui est le plus sensible aux températures élevées. Le degré de purification influence significativement la thermostabilité de la PEPC au sein de chacun des écotypes ($F=5,27$; $P<0,05$).

La figure VI met en évidence le caractère biphasique des courbes de dénaturation de la PEPC de *Echinochloa crus-galli*, et ce quel que soit le niveau de

purification. On constate que l'enzyme montre une dénaturation plus prononcée durant la période initiale du traitement thermique.

Les ANOVAR des valeurs transformées ($\arcsin\sqrt{P}$) indiquent des différences significatives entre les populations pour les extraits crus (Séphadex G-25: $F=11,58$; $P<0,05$) et des différences très significatives en ce qui a trait aux extraits partiellement purifiés (PEG 13%: $F= 39,61$; $P<0,01$). Par contre, on n'observe pas de différences significatives entre les extraits purifiés (DEAE-sépharose: $F=2,74$; $P>0,05$). On retrouve cependant des différences significatives ($F= 5,27$; $P<0,05$) entre les niveaux de purification. Les ANOVA indiquent qu'il y a des différences significatives entre les populations pour Séphadex G-25 et PEG 13% et ce, à chaque période de temps (voir annexe II). Des ANOVAR effectuées avec les valeurs non-transformées ont donné des degrés de signification similaires.

Tableau 4. Valeur des F et degré de signification des tests d'ANOVAR pour les valeurs transformées ($\arcsin\sqrt{P}$) de thermodénaturation à 47°C.

ANOVAR	F	P¹
Différences entre les populations		
Extraits crus (G-25)	11,585	*
Partiellement purifiés (PEG)	39,607	**
Purifiés (DEAE)	2,737	NS
Différences entre les niveaux de purification	5,274	*

¹ $P<0,05$ * significatif, $P<0,01$ ** très significatif, $P<0,001$ *** hautement significatif, $P>0,05$ NS non significatif.

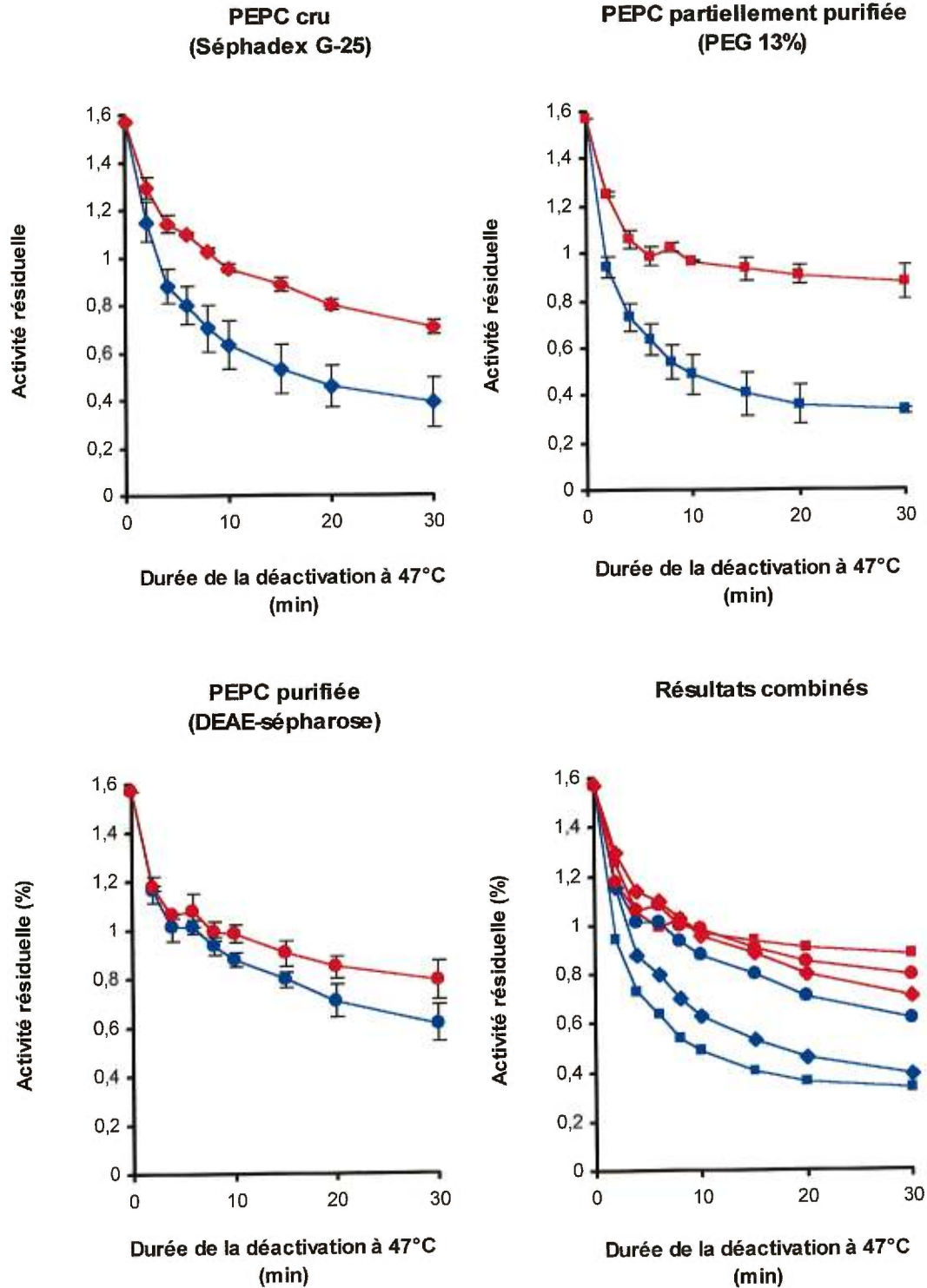


Figure IX. Thermodénaturation de la PEPC exprimée en log du pourcentage d'activité résiduelle en fonction de la durée de dénaturation à 47°C pour les populations Mississippi et Québec d'*Echinochloa crus-galli*, à chaque niveau de purification. Chaque point représente la valeur moyenne tirée de trois échantillons indépendants. ♦ : Québec Séphadex G-25; ◆ : Mississippi Séphadex G-25; ■ : Québec PEG 13%; ◆ : Mississippi PEG 13%; ● : Québec DEAE-sépharose; ● : Mississippi DEAE-sépharose.

3.2.2 STABILITÉ AUX BASSES TEMPÉRATURES (0°C)

La figure X montre les courbes du pourcentage d'activité résiduelle en fonction de la durée de dénaturation à 0°C pour chacun des niveaux de purification des deux populations. L'analyse de variance à mesures répétées (ANOVAR) des valeurs de pourcentage d'activité résiduelle de la PEPC est présentée au tableau 5.

Nos résultats indiquent que les extraits de PEPC des deux populations maintiennent une activité relativement stable et similaire à celle du contrôle quel que soit le temps de dénaturation. Les ANOVAR confirment cette absence de différences significatives entre les deux populations, et la présence de différences significatives entre les purifications ($F=5,71$; $P<0,05$). Le seul extrait présentant une légère perte d'activité est l'extrait cru de QUÉ (Séphadex G-25).

Tableau 5. Valeurs des F et degré de signification des tests d'ANOVAR pour les valeurs de stabilité à 0°C

ANOVAR	F	P ¹
Différences entre les populations		
Extraits crus (G-25)	3,655	NS
Partiellement purifiés (PEG)	0,104	NS
Purifiés (DEAE)	7,280	NS
Différence entre les niveaux de purification	5,710	*

¹P<0,05 * significatif, P<0,01 ** très significatif, P<0,001 *** hautement significatif, P>0,05 NS non significatif.

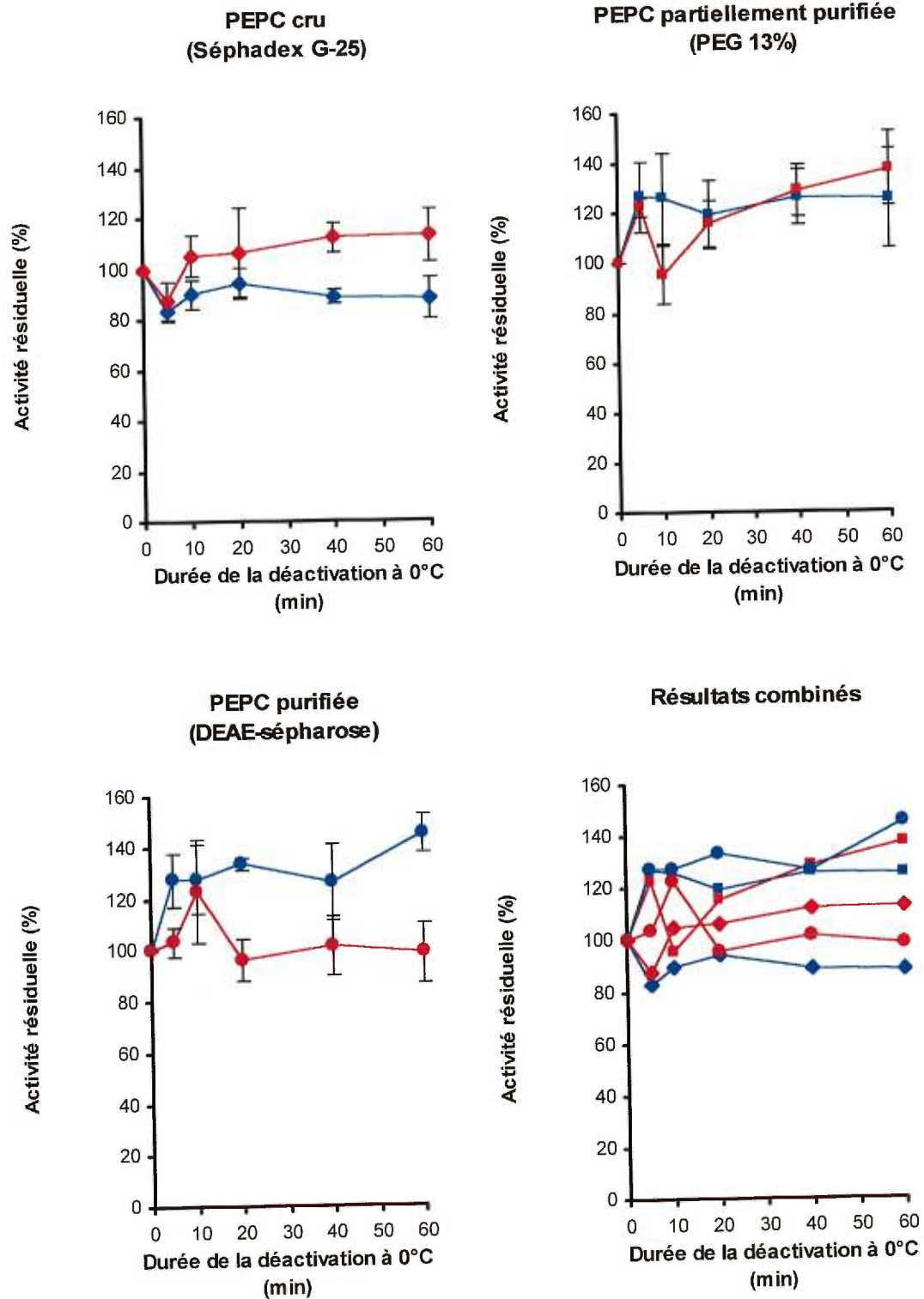


Figure X. Stabilité de la PEPC exprimée en pourcentage d'activité résiduelle en fonction de la durée de dénaturation à 0°C pour les populations Mississippi et Québec d'*Echinochloa crus-galli*. Chaque point représente la valeur moyenne tirée de trois échantillons indépendants. ◆: Québec Séphadex G-25; ◆: Mississippi Séphadex G-25; ■: Québec PEG 13%; ■: Mississippi PEG 13%; ●: Québec DEAE-sépharose; ●: Mississippi DEAE-sépharose.

3.3 PROPRIÉTÉS CINÉTIQUES DE LA PEPC

3.3.1 ÉNERGIE D'ACTIVATION APPARENTE (E_a)

Les résultats obtenus pour les énergies d'activation de la PEPC des extraits crus, partiellement purifiés et purifiés d'*Echinochloa crus-galli* sont présentés à la figure XI. Les résultats des tests d'ANOVAR sont présentés au tableau 6.

Les valeurs d'énergie d'activation apparente E_a (PEP) pour la PEPC sont basées sur les logarithmes naturels des Q_{10} ($\ln Q_{10}$) estimés pour des températures entre 10°C et 40°C dans le cas des extraits crus et pour des températures entre 5°C et 40°C pour les extraits partiellement et totalement purifiés. De façon générale, les résultats montrent une baisse de l'énergie d'activation en fonction d'une augmentation de la température d'essai. Ainsi, pour l'écotype QUÉ les valeurs des E_a pour les trois niveaux de purification varient entre 65 KJ /mol et 39 KJ/mol. Pour MISS, les valeurs passent de 86,4 KJ/mol à 31,7 KJ/mol. Les valeurs décroissent considérablement pour les Q_{10} des températures entre 30°C et 40°C, et ce indépendamment des purifications. Quel que soit le niveau de purification, les ANOVAR indiquent que les deux populations ne montrent pas de différences en ce qui concerne leurs E_a ($P>0.05$), bien que les courbes des E_a indiquent une tendance vers des E_a plus faibles pour la population QUÉ aux Q_{10} entre 15/5 °C et 25/15 °C. Les analyses statistiques (ANOVAR) ne présentent pas de différences significatives ($F=0,445$; $P>0.05$) entre les niveaux de purification. Les résultats des tests d'ANOVA ne présentent pas de différences significatives entre les E_a de QUÉ et MISS à chacun des Q_{10} mesurées.

Tableau 6. Valeurs des F et degré de signification des tests d'ANOVAR pour les valeurs d' E_a .

ANOVAR	F	P ¹
Différences entre les populations		
Extraits crus (G-25)	3,414	NS
Partiellement purifiés (PEG)	0,889	NS
Purifiés (DEAE)	1,625	NS
Différences entre les niveaux de purification	4,445	NS

¹P<0,05 * significatif, P<0,01 ** très significatif, P<0,001 *** hautement significatif, P>0,05 NS non significatif.

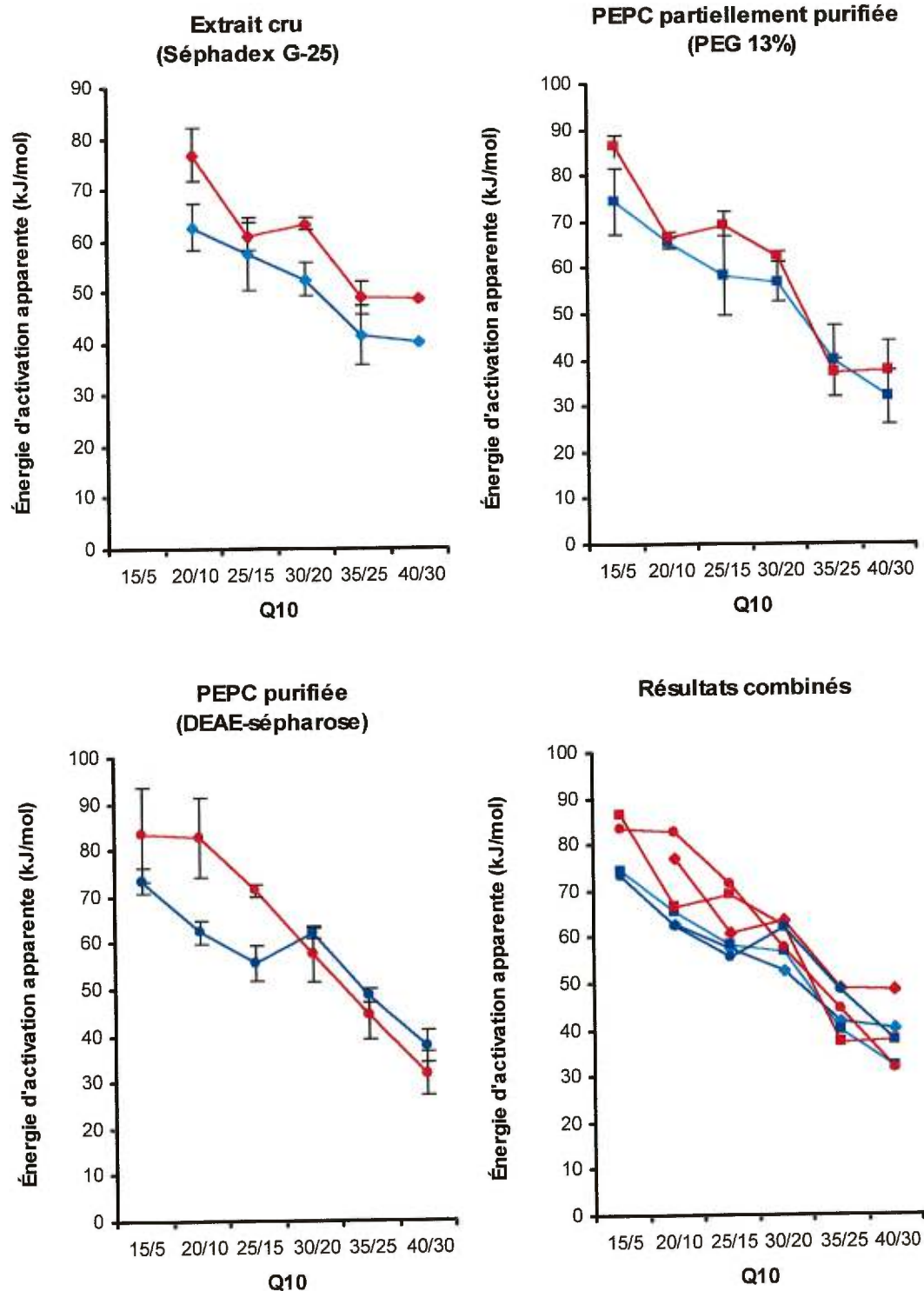


Figure XI. Énergie d'activation apparente (E_a) de la PEPC en fonction des coefficients thermiques, exprimée en KJ/mol, des plantes d'*Echinochloa crus-galli* du Québec (QUÉ) et du Mississippi (MISS), aux trois niveaux de purification. Chaque point représente la valeur moyenne tirée de trois échantillons indépendants. ◆ : Québec Séphadex G-25; ◆ : Mississippi Séphadex G-25; ■ : Québec PEG 13%; ■ : Mississippi PEG 13%; ● : Québec DEAE-sépharose; ● : Mississippi DEAE-sépharose.

3.3.2 CONSTANCE DE MICHAELIS-MENTEN (K_m APPARENT)

Les résultats obtenus pour les études de K_m apparents de la PEPC sont présentés aux figures XII (K_m PEP) et XIII (K_m Mg^{2+}) respectivement. Les résultats des tests d'ANOVAR sont présentés au tableau 7 et 8.

Les valeurs des K_m (PEP) furent obtenues à partir de huit températures d'essai (de 5°C à 40°C avec un intervalle régulier de 5°C) pour les extraits partiellement purifiés et purifiés de chaque population et pour sept températures d'essais (10°C à 40°C, avec un intervalle régulier de 5°C) pour les extraits crus. Les valeurs des K_m (PEP) pour les extraits crus se situent entre 0.31 et 2.08 mM PEP, ces valeurs se rapprochent de celles rapportées par Simon *et al.* (1984b). La moyenne des valeurs K_m (PEP) des essais, analysés à une température de 30°C pour l'extrait purifié, est environ de 0.77 mM PEP, valeur similaire à celle de 0.8 mM PEP rapportée par Ashton *et al.* (1990) pour la PEPC purifiée de *Zea mays*. La figure IX montre qu'entre 5°C et 35°C, les valeurs des K_m apparents (PEP) des deux populations étudiées diminuent quelque soit le niveau de purification des extraits. Par contre, on remarque une augmentation plus ou moins marquée des valeurs de K_m entre 35 et 40°C. Pour les deux populations, les extraits crus possèdent des valeurs de K_m nettement les plus basses. En général, les extraits du QUÉ ont des valeurs de K_m (PEP) environ deux fois plus faibles que ceux du MISS.

Les tests d'ANOVAR présentent des différences très significatives (Séphadex G-25: $F=24,17$; $P<0.01$) entre les valeurs de K_m (PEP) des plantes QUÉ et MISS pour les extraits crus. Les résultats des tests d'ANOVA (annexe III) indiquent que ces différences significatives sont perçues aux températures d'essai de 10°C à 20°C. Au-delà de cet intervalle, les ANOVA n'indiquent plus de différences significatives. Les ANOVAR indiquent des différences significatives (DEAE-sépharose: $F=10,74$; $P<0,05$) pour les valeurs de K_m (PEP) des extraits purifiés des deux populations. Les ANOVA nous indiquent que ces différences sont très significatives à la température d'essai de 5°C, et significatives à 20°C, 30°C et 40°C. Les valeurs de K_m des extraits partiellement purifiés ne présentent aucune

différences significatives entre les populations suite aux tests d'ANOVAR (PEG 13%: $F=5.74$; $P>0.05$). Les tests d'ANOVA effectués pour les extraits partiellement purifiés montrent néanmoins qu'il y a des différences significatives entre les populations pour les basses températures soit à 10°C et 15°C. En ce qui concerne les différences entre les étapes de purifications, les ANOVAR présentent des différences très significatives ($F=12,76$; $P<0.01$) entre les valeurs de K_m selon les niveaux de purification.

Les valeurs des K_m (Mg^{2+}) furent obtenues à partir de sept températures d'essais (10 à 40°C) pour tous les extraits de chaque population. Les valeurs des K_m (Mg^{2+}) pour les extraits crus décroissent en fonction des températures d'essai et se situent entre 0.29 et 1.13 mM Mg^{2+} . Ces valeurs se rapprochent des valeurs rapportées dans la littérature pour la PEPC extraite du maïs qui possède des K_m (Mg^{2+}) qui varient entre 0.1mM et 1mM (O'Leary, 1982). La figure X montre qu'entre 20°C et 40°C, les valeurs des K_m apparents (Mg^{2+}) des extraits partiellement et totalement purifiés augmentent quelle que soit la population. Pour les deux populations, les extraits crus possèdent des courbes d'une allure différente à celles des deux autres niveaux de purification.

Malgré une légère tendance pour des valeurs de K_m (Mg^{2+}) plus faible pour la population du MISS aux températures plus élevée (30 à 40°C), les tests d'ANOVAR ne présentent pas de différences significatives ($P>0.05$) entre les plantes QUÉ et MISS ni entre les niveaux de purification.

Contrairement au patron des valeurs de K_m (PEP), celui des valeurs de K_m (Mg^{2+}) présenté à la figure X montre que l'affinité de l'enzyme pour son co-facteur diminue suivant l'augmentation de la température d'essai (uniquement pour les extraits partiellement et totalement purifiés), alors que l'inverse est observé pour les extraits crus (Séphadex G-25).

Tableau 7. Valeurs des F et degré de signification des tests d'ANOVAR pour les valeurs de K_m (PEP).

ANOVAR	F	P ¹
Différences entre les populations		
Extraits crus (G-25)	24,168	**
Partiellement purifiés (PEG)	5,736	NS
(5°C à 20°C)	9,650	*
Purifiés (DEAE)	10,738	*
Différences entre les niveaux de purification	12,706	**

¹P<0,05 * significatif, P<0,01 ** très significatif, P<0,001 *** hautement significatif, P>0,05 NS non significatif.

Tableau 8. Valeurs des F et degré de signification des tests d'ANOVAR pour les K_m (Mg^{2+}).

ANOVAR	F	P ¹
Différences entre les populations		
Extraits crus (G-25)	6,390	NS
Partiellement purifiés (PEG)	0,0073	NS
Purifiés (DEAE)	0,1413	NS
Différences entre les niveaux de purification	1,561	NS

¹P<0,05 * significatif, P<0,01 ** très significatif, P<0,001 *** hautement significatif, P>0,05 NS non significatif.

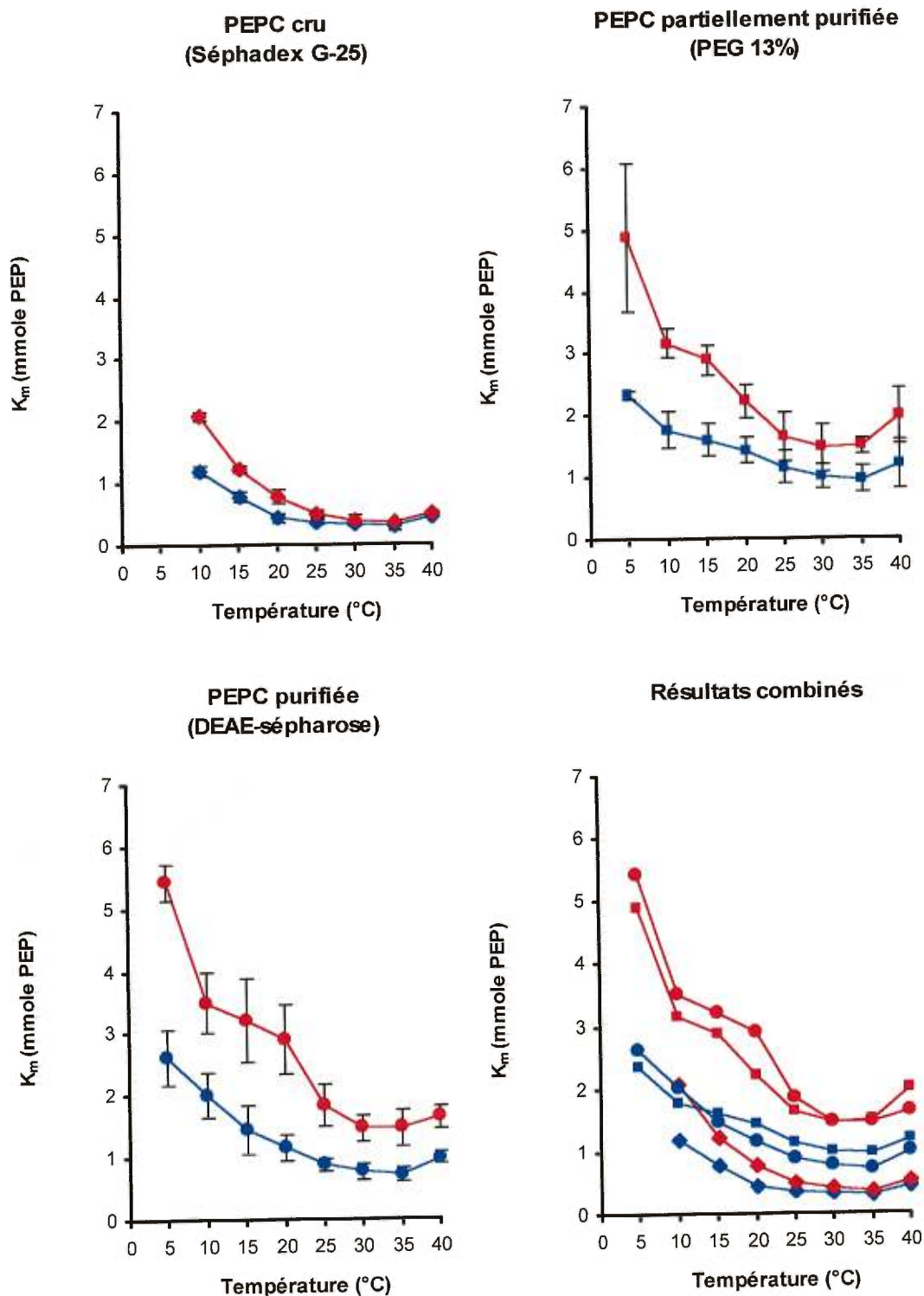


Figure XII. Constante de Michaelis-Menten (K_m) (PEP) de la PEPC exprimée en mmol, à différentes températures d'essais, pour les extraits crus, partiellement purifiés et purifiés des plantes d'*Echinochloa crus-galli* du Québec et du Mississippi. Chaque point représente la valeur moyenne tirée de trois échantillons indépendants. ◆: Québec Séphadex G-25; ◆: Mississippi Séphadex G-25; ■: Québec PEG 13%; ■: Mississippi PEG 13%; ●: Québec DEAE-sépharose; ●: Mississippi DEAE-sépharose.

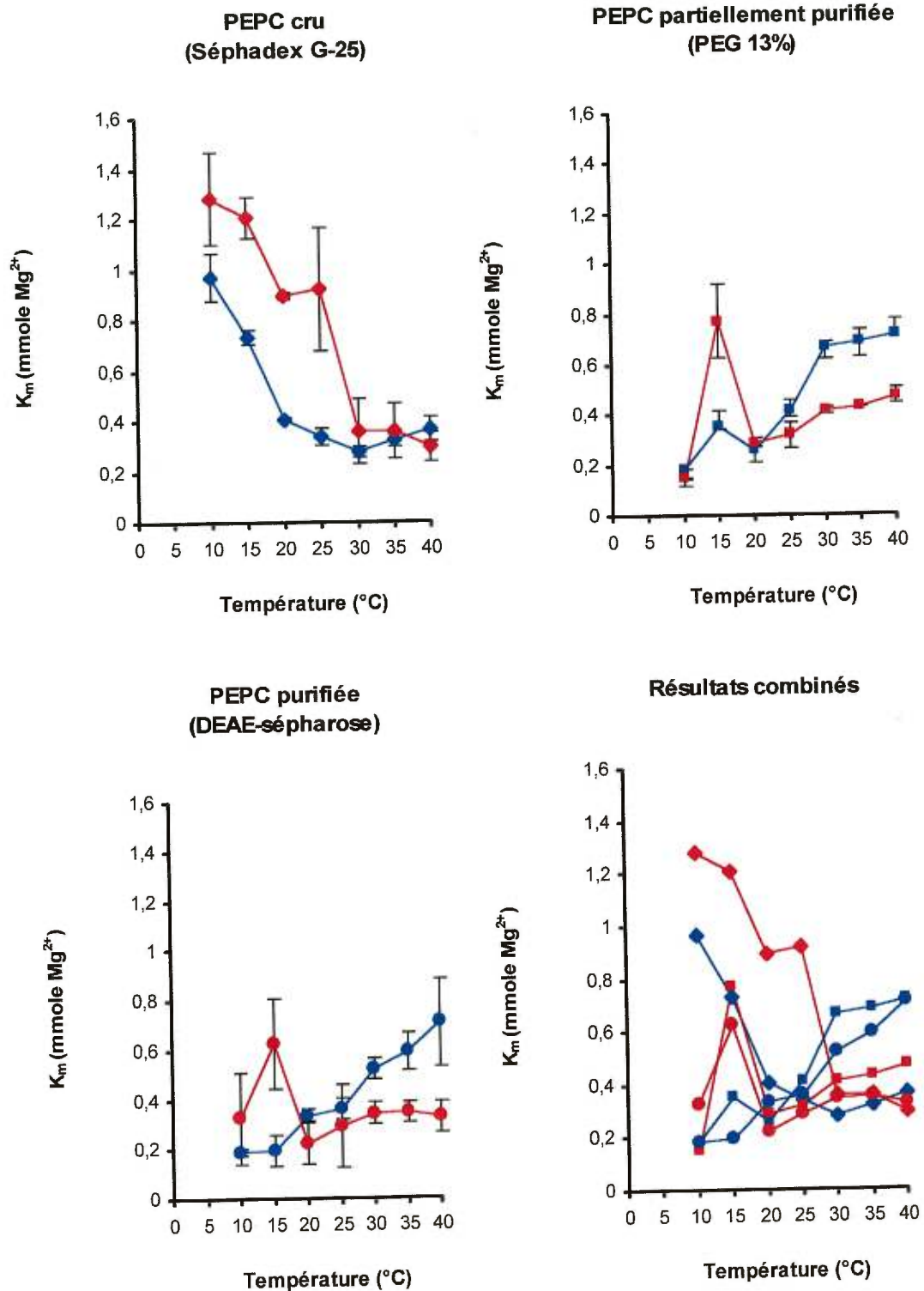


Figure XIII. Constante de Michaelis-Menten (K_m) pour le Mg^{2+} , de la PEPC exprimée en mmol, à différentes températures d'essais, pour les extraits crus, partiellement purifiés et purifiés des plantes d'*Echinochloa crus-galli* du Québec et du Mississippi. Chaque point représente la valeur moyenne tirée de trois échantillons indépendants. ◆: Québec Séphadex G-25; ◆: Mississippi Séphadex G-25; ■: Québec PEG 13%; ■: Mississippi PEG 13%; ●: Québec DEAE-sépharose; ●: Mississippi DEAE-sépharose.

3.3.3 VITESSE MAXIMALE (V_{MAX})

La figure XVI montre les courbes de la vitesse maximale (V_{max}) exprimées en μmol de PEP mg^{-1} P min^{-1} , en fonction des températures d'essais. Les résultats des tests d'ANOVAR sont présentés au tableau 9.

Chez les deux populations, les V_{max} pour le substrat PEP augmentent avec la température indépendamment des niveaux de purifications. Ceci est certainement une conséquence directe de l'augmentation de l'énergie cinétique à haute température. Cette augmentation est plus prononcée aux températures d'essai supérieures à 20°C , en particulier pour l'extrait partiellement purifié de la population QUÉ. Les valeurs V_{max} de Québec sont légèrement supérieures à celles de Mississippi, sauf pour l'extrait purifié.

Les tests d'ANOVAR n'indiquent pas de différences significatives ($P > 0,05$) entre les populations ni entre les purifications sauf pour la purification partielle (PEG 13%: $F=17,33$; $P < 0,05$) où des différences significatives entre les populations sont observées.

Tableau 9. Valeurs des F et degré de signification des tests d'ANOVAR pour les valeurs de V_{max} (PEP).

ANOVAR	F	P ¹
Différences entre les populations		
Extraits crus (G-25)	0,0175	NS
Partiellement purifiés (PEG)	17,326	*
Purifiés (DEAE)	2,066	NS
Différences entre les niveaux de purification	1,408	NS

¹ $P < 0,05$ * significatif, $P < 0,01$ ** très significatif, $P < 0,001$ *** hautement significatif, $P > 0,05$ NS non significatif.

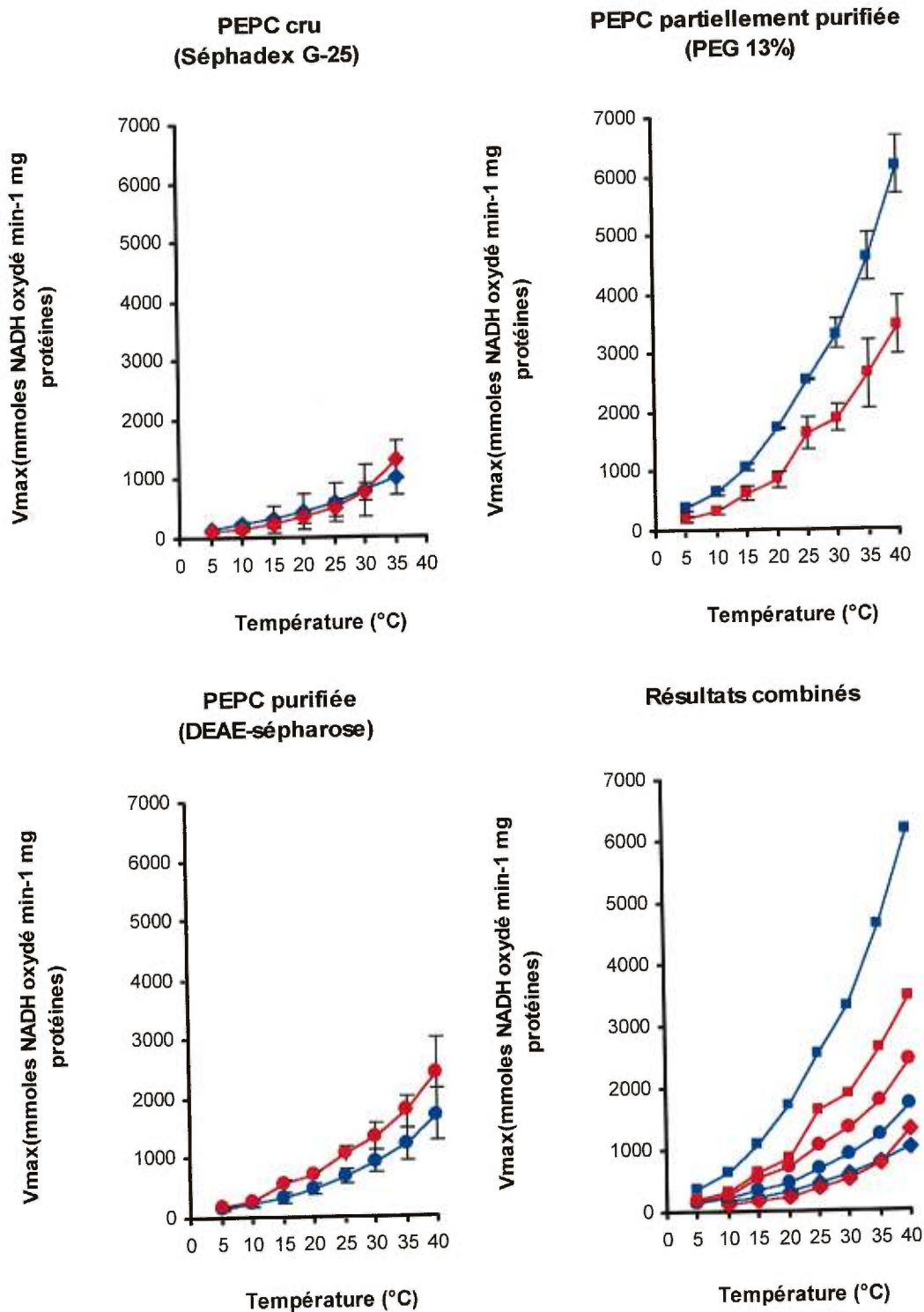


Figure XIV. Vitesse maximale (V_{max}) (PEP) de la PEPC exprimée en μmol de PEP mg^{-1} P min^{-1} , à différentes températures d'essais, pour les extraits crus, partiellement purifiés et purifiés des plantes d'*Echinochloa crus-galli* du Québec et du Mississippi. Chaque point représente la valeur moyenne tirée de trois échantillons indépendants. \blacklozenge : Québec Séphadex G-25; \blacklozenge : Mississippi Séphadex G-25; \blacksquare : Québec PEG 13%; \blacksquare : Mississippi PEG 13%; \bullet : Québec DEAE-sépharose; \bullet : Mississippi DEAE-sépharose

3.3.4 RAPPORT V_{MAX}/K_M

Les résultats obtenus pour les rapports de V_{max}/K_m pour le substrat PEP et pour le co-facteur Mg^{2+} sont présentés aux figures XV et XVI respectivement. Les résultats des tests d'ANOVAR sont présentés aux tableau 10 et 11.

Les rapports V_{max}/K_m (PEP) sont exprimés en $\mu\text{mole NADH oxydé min}^{-1}$ par mg^{-1} protéine mM^{-1} PEP. Le graphique XV montre que le rapport V_{max}/K_m augmente en fonction des températures d'essai pour les extraits issus des deux populations. Cette augmentation s'accroît vers les hautes températures d'essai.

Les résultats des analyses de variances à mesures répétées indiquent des différences très significatives entre les populations Québec et Mississippi au niveau des extraits crus (Séphadex G-25: $F=47,03$; $P<0,01$). Les valeurs du rapport V_{max}/K_m de la population QUÉ étant nettement supérieures à celles du MISS. Les ANOVAR démontrent qu'il n'y a pas de différences significatives entre les populations pour les deux autres niveaux de purification (PEG 13%: $F=6,085$; $P>0,05$ et DEAE-sépharose: $F=0,005$; $P>0,05$). Les ANOVA pour les extraits partiellement purifiés montrent qu'il y a des différences significatives entre les populations aux basses températures d'essais soit : $5^{\circ}\text{C}(**)$, $10^{\circ}\text{C}(*)$, $15^{\circ}\text{C}(*)$, $20^{\circ}\text{C}(*)$. De plus, on note des différences très significatives entre les trois niveaux de purification ($F=8,63$; $P<0,01$).

Les rapports V_{max}/K_m (Mg^{2+}) sont exprimés en $\mu\text{mole NADH oxydé min}^{-1}$ par mg^{-1} protéine mM^{-1} Mg^{2+} . Les valeurs V_{max}/K_m pour le co-substrat Mg^{2+} sont plus stables que ceux pour le substrat PEP. Le patron des V_{max}/K_m montre une augmentation plus ou moins marquée jusqu'à une température de 30°C suivie d'une chute des valeurs, très accentuée pour les extraits crus des deux populations. Comme pour les V_{max}/K_m pour le PEP, les valeurs pour les extraits de la population QUÉ tendent à être supérieures à celles de la population MISS, mais les résultats des tests d'ANOVAR ne montrent pas de différences significatives entre les populations Québec et Mississippi pour chacun des trois niveaux de

purification. Les résultats des ANOVAR ne présentent pas non plus de différences significatives entre les purifications.

Tableau 10. Valeur des F et degré de signification des tests d'ANOVAR pour les valeurs des rapports V_{\max}/K_m (PEP).

ANOVAR	F	P ¹
Différences entre les populations		
Extraits crus (G-25)	47,029	**
Partiellement purifiés (PEG)	6,085	NS
Purifiés (DEAE)	0,0045	NS
Différences entre les niveaux de purification	8,628	**

¹P<0,05 * significatif, P<0,01 ** très significatif, P<0,001 *** hautement significatif, P>0,05 NS non significatif.

Tableau 11. Valeur des F et degré de signification des tests d'ANOVAR pour les rapports V_{\max}/K_m (Mg^{2+}).

ANOVAR	F	P ¹
Différences entre les populations		
Extraits crus (G-25)	0,391	NS
Partiellement purifiés (PEG)	2,927	NS
Purifiés (DEAE)	0,0042	NS
Différences entre les niveaux de purification	1,478	NS

¹ P<0,05 * significatif, P<0,01 ** très significatif, P<0,001 *** hautement significatif, P>0,05 NS non significatif.

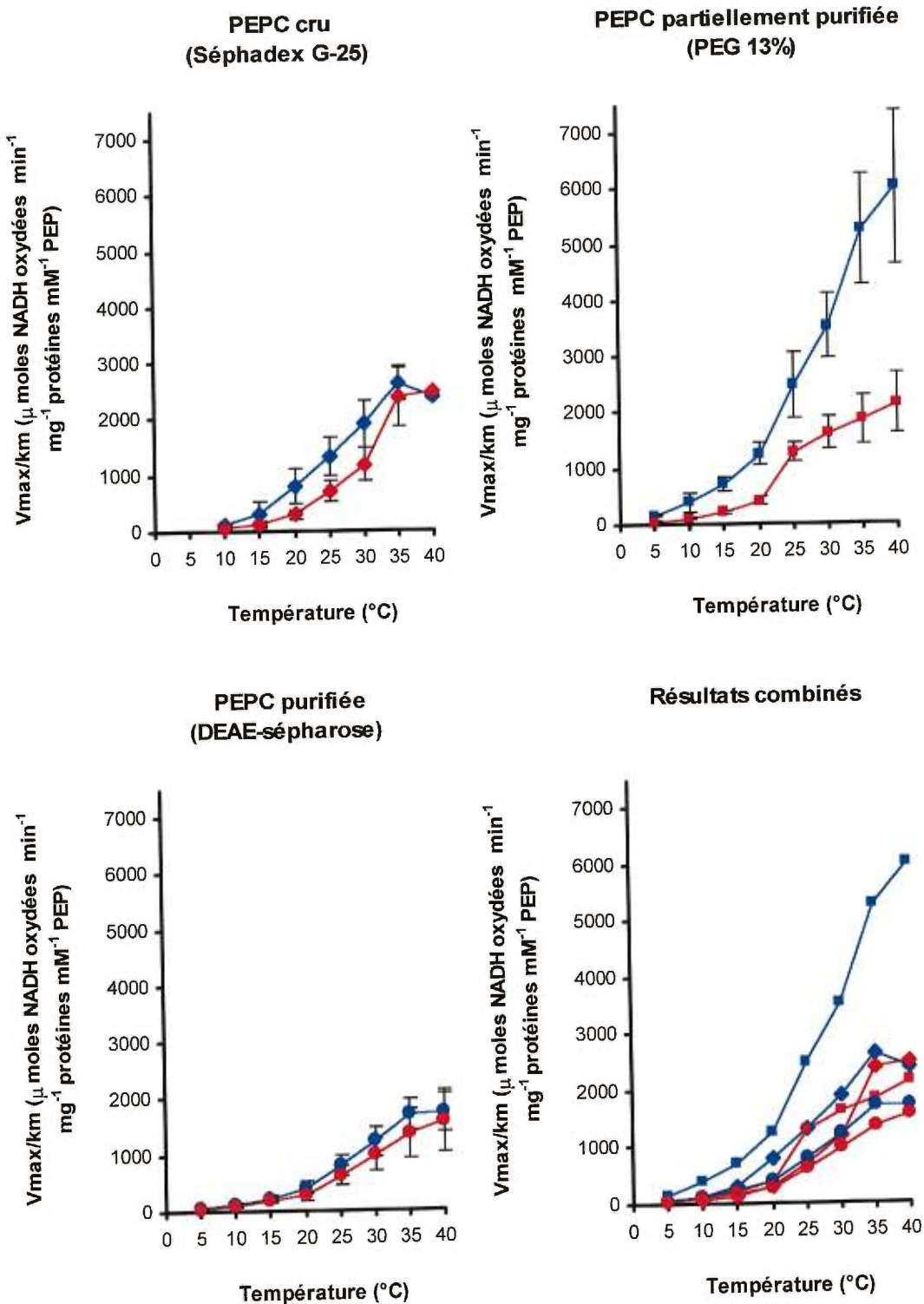


Figure XV. Rapports V_{max}/K_m (PEP) de la PEPC exprimés en $\mu\text{mole NADH oxyd}\ddot{\text{e}} \text{ min}^{-1}$ par mg^{-1} protéine mM^{-1} PEP, aux différentes températures d'essais, pour les extraits crus, partiellement purifiés et purifiés des plantes d'*Echinochloa crus-galli* du Québec et du Mississippi. Chaque point représente la valeur moyenne tirée de trois échantillons indépendants. \blacklozenge : Québec Séphadex G-25; \blacklozenge : Mississippi Séphadex G-25; \blacksquare : Québec PEG 13%; \blacksquare : Mississippi PEG 13%; \bullet : Québec DEAE-sépharose; \bullet : Mississippi DEAE-sépharose.

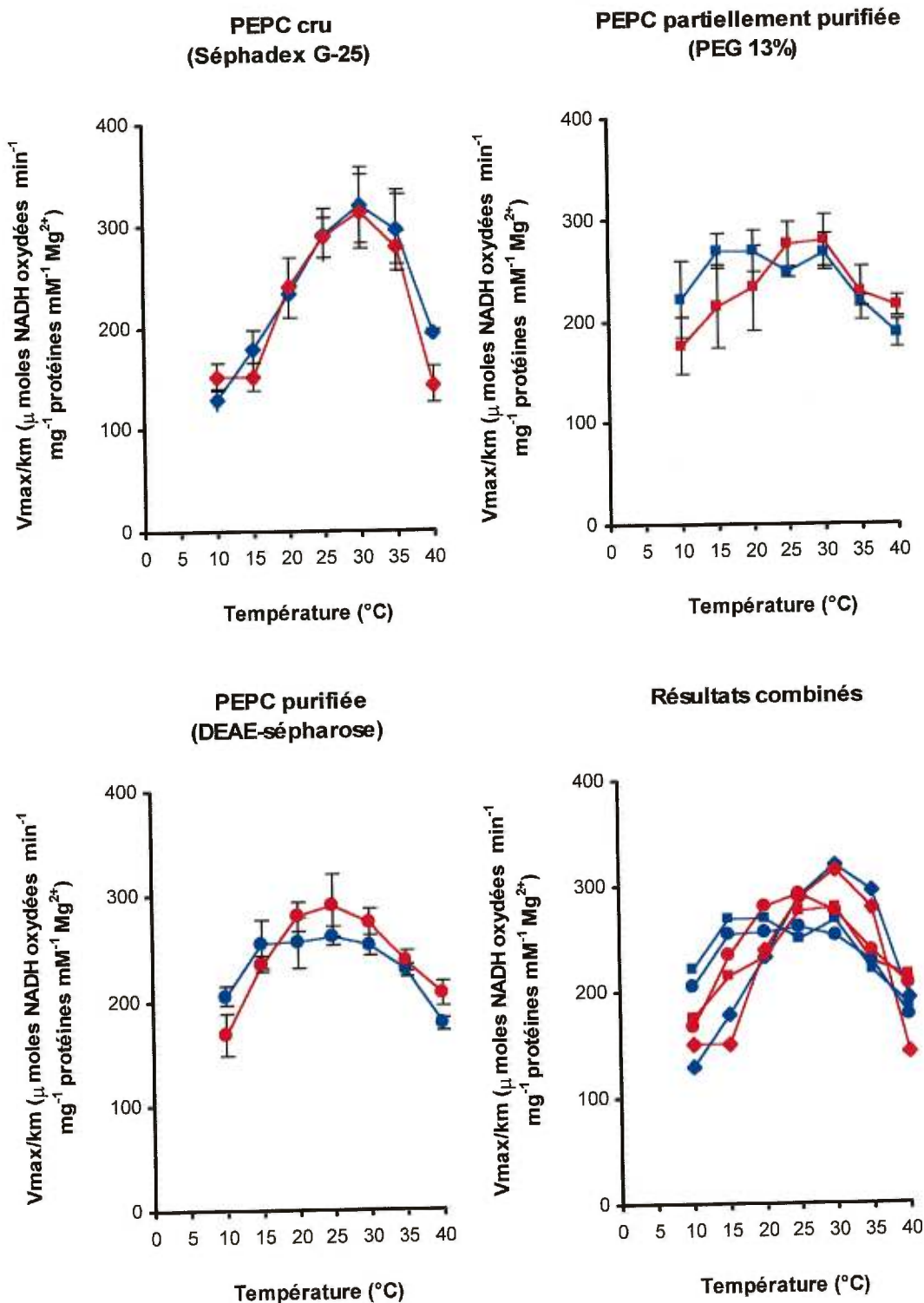


Figure XVI. Rapports V_{max}/K_m (Mg^{2+}) de la PEPC exprimés en $\mu\text{mole NADH oxyd}\acute{e}\text{e min}^{-1}$ par mg^{-1} protéine $\text{mM}^{-1} \text{Mg}^{2+}$, aux différentes températures d'essais, pour les extraits crus, partiellement purifiés et purifiés des plantes d'*Echinochloa crus-galli* du Québec et du Mississippi. Chaque point représente la valeur moyenne tirée de trois échantillons indépendants. \blacklozenge : Québec Séphadex G-25; \blacklozenge : Mississippi Séphadex G-25; \blacksquare : Québec PEG 13%; \blacksquare : Mississippi PEG 13%; \bullet : Québec DEAE-sépharose; \bullet : Mississippi DEAE-sépharose.

3.3.5 INDICATEUR DU POUVOIR CATALYTIQUE (K_{CAT})

La figure XVII présente le graphique des K_{cat} (PEP) en fonction des températures d'essais pour les extraits purifiés (DEAE-s) de chaque population. Les résultats des tests d'ANOVAR sont présentés au tableau 12.

Les valeurs K_{cat} (PEP), exprimés en unités de substrat par sec^{-1} , sont calculés pour des températures d'essai de 5°C à 40°C. Pour les deux populations étudiées, les valeurs de K_{cat} augmentent en fonction des températures d'essai. Les valeurs du pouvoir catalytique K_{cat} pour la PEPC des plantes QUÉ varient entre 132,9 (5°C) et 1434,5 (40°C) et pour MISS entre 68,8 (5°C) et 1910,2 (40°C). Comme le montre la figure XVI, à basse température (5°C à 15°C) les valeurs K_{cat} de la population QUÉ sont supérieures à celles de la population MISS. Mais aux essais supérieurs à 20°C, les valeurs pour la PEPC purifiée MISS sont significativement supérieures que celles de QUÉ. Ce qui suggère que la PEPC purifiée des feuilles de QUÉ a un pouvoir catalytique plus élevé aux basses températures que la PEPC purifiée à partir des feuilles de MISS, alors que le contraire se produit pour la PEPC de MISS.

L'analyse statistique (test d'ANOVAR) révèle des différences significatives ($F= 12,35$; $P<0,05$) entre les plantes des populations QUÉ et MISS sur l'ensemble des températures d'essai. Par contre des ANOVAR réalisées pour les basses températures d'essai (5°C à 15°C) montrent qu'il y a aucune différences significatives entre les populations alors que les ANOVAR pour les hautes températures (20°C à 40°C) montrent des différences très significatives. Par contre les ANOVA (voir annexe IV) montrent que les différences entre les populations sont significatives pour les températures d'essai individuelles de 5°C, 20°C, 25°C et hautement significatives pour la température d'essai de 35°C.

Tableau 12. Valeur des F et degré de signification des tests d'ANOVAR pour les K_{cat} .

ANOVAR	F	P¹
Différences entre les populations		
5°C à 40°C	12,35	P<0,05
5°C à 15°C	2,07	P>0,05
20°C à 40°C	24,67	P<0,01

¹ P<0,05 * significatif, P<0,01 ** très significatif, P<0,001 *** hautement significatif, P>0,05 NS non significatif.

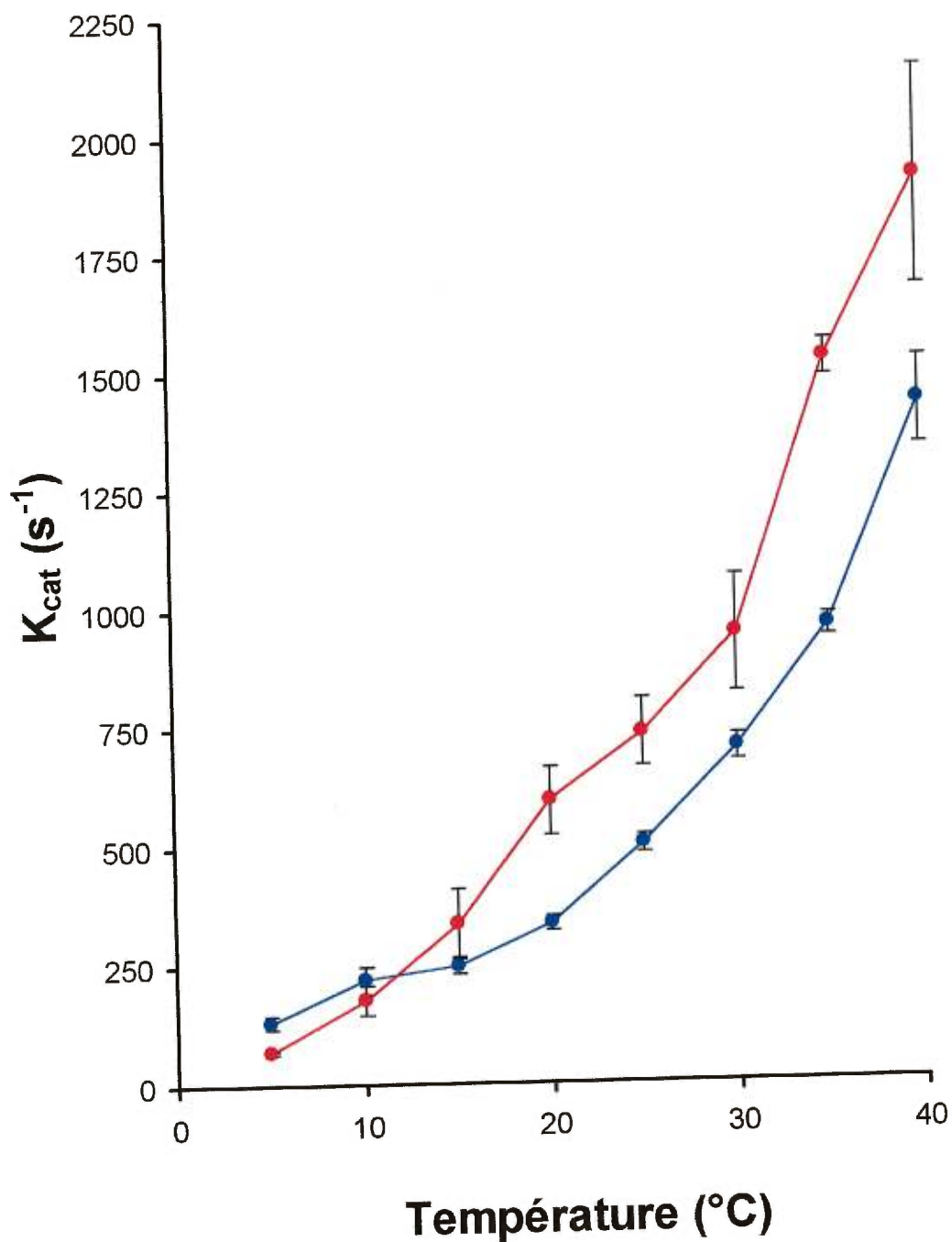


Figure XVII. K_{cat} (PEP) de la PEPC purifiée aux différentes températures d'essais exprimé en s^{-1} , des plantes d'*Echinochloa crus-galli* du Québec et du Mississippi. Chaque point représente la valeur moyenne tirée de trois échantillons indépendants. ●: Québec DEAE-sépharose; ●: Mississippi DEAE-sépharose. Les tests d'ANOVAR indiquent une valeur de $F= 12,354$; $P<0,05$ * pour la comparaison entre populations.

3.4 RÉCAPITULATION

Pour conclure ce chapitre, nous avons cru utile d'ajouter le tableau 13 qui est une compilation des résultats et de leurs significations statistiques, afin de mettre en évidence les différences trouvées entre les populations lors de nos analyses.

Tableau 13. Tableau récapitulatif des différences, telle que déterminées par les ANOVAR, dans les propriétés thermiques et cinétiques des extraits crus, partiellement purifiés et hautement purifiés de la PEPC entre les plantes QUÉ et MISS d'*Echinochloa crus-galli*.

Purification	Propriété	Différence entre les populations ¹
Extrait cru (Séphadex G-25)	Activité spécifique	NS
	Thermodénaturation à 47°C	*
	Stabilité à 0°C	NS
	Énergie d'activation	NS
	K_m (PEP)	**
	V_{max} (PEP)	NS
	V_{max}/K_m (PEP)	**
	K_m (Mg^{2+})	NS
	V_{max}/K_m (Mg^{2+})	NS
Purification partielle (PEG 13%)	Activité spécifique	**
	Thermodénaturation à 47°C	**
	Stabilité à 0°C	NS
	Énergie d'activation	NS
	K_m (PEP)	NS (* de 5°C à 20°C)
	V_{max} (PEP)	*
	V_{max}/K_m (PEP)	NS
	K_m (Mg^{2+})	NS
	V_{max}/K_m (Mg^{2+})	NS
Purification complète (DEAE-sépharose)	Activité spécifique	NS
	Thermodénaturation à 47°C	NS
	Stabilité à 0°C	NS
	Énergie d'activation	NS
	K_m (PEP)	*
	V_{max} (PEP)	NS
	V_{max}/K_m (PEP)	NS
	K_m (Mg^{2+})	*
	V_{max}/K_m (Mg^{2+})	NS
	K_{cat}	*

¹P<0,05 (*) significatif, P<0,01 (**) très significatif, P<0,001 (***) hautement significatif, P>0,05 (NS) non significatif.

Chapitre IV

Discussion

Les résultats présentés dans la section précédente mettent en évidence un certain nombre de différences dans les propriétés thermiques et cinétiques de la PEPC, différences qui ne sont pas reflétées dans la mobilité électrophorétique et le point isoélectrique de l'enzyme.

4.1 PROPRIÉTÉS ÉLECTROPHORÉTIQUES

4.1.1 POIDS MOLÉCULAIRE

Les analyses électrophorétiques sur gels à gradient de polyacrylamide indiquent que l'enzyme PEPC est représentée par une seule forme moléculaire d'enzyme chez les deux écotypes d'*Echinochloa crus-galli* étudiés, Québec et Mississippi. Le poids moléculaire de l'enzyme non dénaturée analysée dans cette étude est de 400 kDa.

Les travaux antérieurs réalisés sur la PEPC non dénaturée extraite de *Zea mays* et de diverses espèces C_4 de type NADP⁺-ME, montrent aussi une forme moléculaire unique pour ces enzymes (Uedan & Sugiyama 1976; Ashton *et al.* 1990). Le poids moléculaire de la PEPC d'*Echinochloa crus-galli* (400 kDa) exposé dans cette étude est identique à celui de notre marqueur, la PEPC du maïs (Sigma Chemical Co.) pour laquelle le service technique de Sigma Chemical Co. a calculé un poids moléculaire de 400kDa. De plus nos résultats sont identiques à ceux rapportés précédemment par d'autres chercheurs pour le maïs soit un poids moléculaires de 400 kDa (O'Leary 1982; Ashton *et al.* 1990) et similaire à ceux rapportés pour le sorgho (440 kDa, Bakrim *et al.* 1992) deux espèces C_4 du type NADP-ME, très proches l'une de l'autre du point de vue évolutif. Le poids moléculaire de la PEPC extraite de *B. fedtschenkoi* est aussi de 400 kDa (Jones *et al.* 1978). Cette espèce est une crassulacée qui photosynthétise selon le métabolisme acide des crassulacées (CAM), la PEPC de ces plantes a une fonction similaire à celle des plantes de photosynthèse C_4 , et un poids identique. Par contre le poids de la PEPC extraite des autres types de plantes (C_3 , Gymnospermes) est plus éloigné. Chez les espèces en C_3 , un poids moléculaire

de 350 kDa fut trouvé pour l'enzyme extraite des cotylédons d'arachides (Maruyama *et al.* 1966).

Les électrophorèses avec ajout de sodium dodécyl sulfate (SDS) montrent une seule bande pour la PEPC des deux populations d'*Echinochloa crus-galli* correspondant à un poids moléculaire de 100 kDa. L'enzyme est donc constituée de quatre sous-unités identiques. Notre enzyme est donc un homotétramère, ce qui est conforme à d'autres résultats publiés. Chez le maïs, la PEPC dénaturée possède un poids moléculaire d'une valeur identique à celle retrouvée dans notre étude (100 kDa), indiquant ainsi que l'enzyme est un tétramère (O'Leary 1982; Jiao & Chollet 1988). Chez le sorgho, Bakrim *et al.* (1992) ont obtenu un poids moléculaire correspondant à 110 kDa alors que pour *B. fedtschenkoi*, une espèce CAM, le poids de l'enzyme dénaturé au SDS est de 100 kDa (Jones *et al.* 1978). Chez ces deux espèces, la PEPC est aussi considérée comme un homotétramère. Les gels d'électrophorèse avec SDS de la PEPC extraite des feuilles d'épinard indique que cette enzyme est un tétramère dont les monomères ont un poids de 130 kDa (Miziorko *et al.* 1974). Chez les Gymnospermes, un poids moléculaire de 110 kDa est estimé pour la PEPC dénaturée extraite de plantule (cotylédons, tigelle, racine) de *Picea abies* (Relle & Wild 1996).

4.1.2 POINT ISOÉLECTRIQUE (PI)

Les résultats des électrophorèses en deux dimensions semblaient indiquer que le pi de la PEPC était de 12. Il nous a paru surprenant que cette enzyme ait un pi si élevé d'autant plus que les enzymes végétales sont reconnues pour avoir des pi plus bas que les enzymes animales et bactériennes (Horton *et al.* 1993). Après plusieurs essais, il demeurait évident que la PEPC restait à l'origine lors de la première dimension. Ce problème fut d'ailleurs rapporté par Budde et Chollet (1986) qui ont réalisé des électrophorèses en deux dimensions avec un extrait cru de PEPC de *Zea mays* sans toutefois mentionner le pi de cette enzyme, dû à l'ambiguïté des résultats. Malgré le fait que la PEPC du maïs a été étudiée pour plusieurs paramètres, nous avons trouvé nulle mention dans la littérature du pi de la PEPC du maïs ce qui nous fut confirmé par le professeur Jean Vidal du

laboratoire de physiologie végétale moléculaire (UA-CNRS, Université de Paris-Sud, Orsay, communication personnelle).

Par contre, les électrophorèses sur gel d'acrylamide à gradient de pH montrent une seule bande pour la PEPC non dénaturée des deux écotypes d'*Echinochloa crus-galli* correspondant à un pI de 4,95. Notre étude montre que le pI de la PEPC non dénaturée d'*Echinochloa crus-galli* est comparable à celui de la PEPC non dénaturée du maïs (SIGMA Chemical Co.) pour laquelle le service technique de Sigma Chemical Co. a calculé un poids moléculaire de 400 kDa. Plusieurs facteurs pourraient expliquer la cause des différences entre ces résultats et ceux des gels en deux dimensions. Il est reconnu qu'une protéine aussi massive que la PEPC (400 kDa) pourrait avoir de la difficulté à pénétrer dans un gel de 4% d'acrylamide, ce qui pourrait expliquer le fait que la PEPC reste à l'origine lors de la première dimension. Cependant, les gels IEF de pH de BIO-RAD contiennent 5% d'acrylamide. De plus, en faisant une électrophorèse en deux dimensions d'un mélange de PEPC et de PPDK, Budde & Chollet (1986) ont réussi à déterminer le pI de la PPDK et non celui de la PEPC, deux enzymes ayant un poids moléculaire similaire (environ 400 kDa). Les analyses antérieures dans notre laboratoire ont confirmé que la PPDK non dénaturée pénètre dans des gels de 5% d'acrylamide (Simon 1996). La cause la plus probable résiderait dans la composition des gels d'acrylamide utilisés dans la première dimension par la méthode de O'Farrell (1975). Les gels en formes de boudins employés lors de la première dimension contiennent entre autres de l'urée, alors que les «IEF ready gels for pI determination» de BIO-RAD en sont exempts. En effet, il fut constaté que l'urée influence étrangement la valeur pK_a des groupements carboxyles, ainsi une grande concentration d'urée peut occasionner des changements importants dans le pI des protéines (O'Farrell 1975).

Comme nous l'avons déjà signalé, il n'y a aucune mention du pI de la PEPC du maïs dans la littérature. Cependant, Lepiniec *et al.* (1993) ont prédit un pI de 5,7 pour la PEPC de *Sorghum*, et ce d'après un programme informatique analysant la séquence en acides aminés de la PEPC (Macvector 3,5 package, IBI, Kodak). Une analyse similaire effectuée avec la PEPC du coton (*Gossypium*

hirsutum) a prédit un pI de 5.95 (Vojdani *et al.* 1997). Malgré le fait que la PEPC du maïs et la PEPC du sorgho soient très proches d'un point de vue évolutif (Lepiniec *et al.* 1993), on observe des substitutions dans les séquences d'acides aminés de la PEPC de ces deux espèces. En analysant les séquences d'acides aminés du maïs (Yanagisawa *et al.* 1989) et du sorgho (Lepiniec *et al.* 1992) on remarque que dans le cas du maïs le nombre total des résidus positivement chargés (ARG, LYS et HIS) et négativement chargés (ASP et GLU) sont de 136 et 135 respectivement et pour le sorgho 136 résidus basiques et 132 résidus acides. Ces différences dans la composition en acide aminé peuvent faire varier à la fois le poids moléculaire et le pI de l'enzyme.

En nous basant sur la séquence d'acides aminés de la PEPC du maïs (Yanagisawa *et al.* 1989) et du sorgho (Lepiniec *et al.* 1992) nous avons calculé le point isoélectrique de ces enzymes à l'aide d'un logiciel informatique (JaMBW, 3.1.6, Heidelberg, Allemagne). La valeur obtenue est de 5,69 pour le maïs et de 5,85 pour le sorgho. Pour une même séquence (sorgho) nous pouvons voir que le pI varie d'un programme informatique à l'autre. Les logiciels se basent sur la sommation des pI de chaque acide aminé composant la protéine, ce qui donne une approximation du pI de la protéine, sans toutefois tenir compte des structures tertiaire et quaternaire de la protéine. En effet, la valeur du pK_a (donc du pI) d'une protéine varie de celle des acides aminés libres. Deux facteurs causent cette perturbation du pI. Premièrement les groupements α -amino et α -carboxyle perdent leurs charges une fois qu'ils sont reliés par des bonds peptidiques. Deuxièmement, la position des acides aminés dans la structure tri-dimensionnelle d'une protéine affecte son pI (Horton *et al.* 1993). Ceci pourrait expliquer les différences entre le pI que nous avons obtenu en laboratoire pour *Echinochloa crus-galli* et *Zea mays* (pI 4,95) et le pI prédit par logiciel informatique (pI 5,68). D'ailleurs, le professeur Jean Vidal (Laboratoire de physiologie végétale moléculaire, UA-CNRS, Université de Paris-Sud, Orsay, communication personnelle) mentionne le fait que le pI de la PEPC du sorgho est de 5,7-5,9 lorsque l'on utilise un programme d'ordinateur et de 5-5,2 lorsque l'on utilise la technique d'électrofocalisation par électrophorèse (données qui n'ont pas été publiées).

L'analogie des résultats des propriétés électrophorétiques de la PEPC suggère qu'il n'y a pas de différences majeures de charge ou de structure pour la PEPC des deux populations. Cependant, il faut mentionner que l'électrophorèse permet de détecter qu'une partie des différences entre les molécules puisque seulement 30% des substitutions dans la séquence des acides aminés occasionnent un changement dans la charge des molécules, et donc dans leur mobilité électrophorétique et leur point isoélectrique (Lewontin 1974; O'Farrell 1975; Simon 1979b).

Les études antérieures réalisées au laboratoire avec les mêmes populations d'*Echinochloa crus-galli* indiquent que pour la déshydrogénase malique NADP⁺, une enzyme C₄, trois isoformes furent constatés chez MISS alors qu'un seul apparaît chez QUÉ (Vairinhos & Simon 1990; Simon & Vairinhos 1991). Cependant les analyses électrophorétiques de l'enzyme malique NADP⁺ (Dubuc *et al.* 1988) et de la pyruvate phosphate dikinase (Simon 1996), deux autres enzymes C₄, indiquent qu'il n'y a pas de différence dans la structure moléculaire de ces enzymes entre QUÉ et MISS. Nos résultats, avec la phospho ϵ no/pyruvate carboxylase, sont similaires et indiquent qu'il n'y a apparemment eu aucune altération majeure dans la structure moléculaire de la PEPC telle que mesurée par l'électrophorèse lors du processus de différenciation écotypique (Potvin 1986; Potvin & Simon 1990) des deux populations d'*Echinochloa crus-galli*.

4.2 ACTIVITÉ SPÉCIFIQUE ET CONTENU EN PROTÉINES DES EXTRAITS

Selon la majorité des études effectuées sur différentes espèces végétales et animales acclimatées et/ou adaptées au froid, le froid tend à augmenter l'activité des enzymes reliées au métabolisme énergétique (Hochachka & Somero 1973; Somero 1978; Simon *et al.* 1989b; Potvin *et al.* 1986). Ce patron d'activité correspond à l'effet compensatoire rapporté par Hochachka et Somero (1973) des enzymes d'organismes adaptés ou acclimatés aux basses températures.

Lors de notre étude, nous avons considéré l'activité spécifique de la PEPC plutôt que l'activité relative de l'enzyme. En effet, l'activité *in vitro* d'une enzyme correspond à la vitesse de la réaction atteinte dans les conditions optimales. L'activité catalytique spécifique tient compte en plus du nombre d'unités d'enzymes par μg de protéines. Pour comparer différentes étapes de purification, il est plus approprié de considérer l'activité spécifique: de cette façon les valeurs varieront parallèlement au facteur de dilution des extraits. Nos résultats indiquent, comme nous nous y attendions, une très grande différence entre l'activité spécifique selon le degré de purification.

Nos analyses portent sur trois niveaux de purifications différentes et on remarque que l'activité spécifique de la PEPC QUÉ est toujours supérieure à celle de MISS, bien que les tests statistiques ont décelé des différences entre les deux populations uniquement pour l'extrait partiellement purifié. La tendance de l'extrait cru (pour une activité spécifique plus élevée de l'extrait cru de QUÉ) se maintient lors de la purification de l'enzyme. Ce qui pourrait être considéré comme une différence adaptative. L'activité spécifique de la PEPC purifiée des plantes d'*Echinochloa crus-galli* QUÉ et MISS est dans le même ordre de grandeur que celle obtenue avec la PEPC purifiée de *Zea mays* purifiée par la même procédure, qui est environ $20 \mu\text{mol mg protéine}^{-1} \text{ par min}^{-1}$ (Ashton *et al.* 1990).

Les études d'Hochachka et Somero (1973) ont permis d'établir trois modèles expliquant la modulation de l'activité enzymatique en réponse aux changements de température. Le premier modèle correspond à l'augmentation de la concentration d'enzymes lors de l'adaptation et/ou de l'acclimatation au froid qui permet de compenser la réduction de cinétique (Hochachka & Somero 1973; Simon *et al.* 1983). Le second modèle établit la corrélation entre l'altération des propriétés catalytiques de l'enzyme lors de l'adaptation ou de l'acclimatation au froid (Hochachka & Somero 1973). Le troisième modèle mentionne l'évolution et les changements quantitatifs des formes moléculaires de l'enzyme (Hochachka & Somero 1973).

Le premier modèle est le plus représentatif de la PEPC d'*Echinochloa crus-galli*. Effectivement, on dénote chez la population du Québec une concentration de protéines totales significativement plus élevée que chez la population Mississippi pour les extraits crus (Séphadex G-25). Considérant que la PEPC représente près de 15% des protéines solubles des feuilles (O'Leary 1982) cette concentration en protéines, plus élevée pour QUÉ, suggère indirectement une concentration d'enzymes plus élevée pour QUÉ. Il est possible qu'au cours du processus d'adaptation, la population QUÉ ait augmenté sa concentration d'enzymes pour pallier aux conditions de températures limitantes durant une partie de son cycle de vie (Potvin & Simon 1990).

Il ressort que la tendance d'une activité spécifique plus élevée de la PEPC des extraits crus conjointement à la concentration de protéines plus élevée de ces mêmes extraits, offrent un avantage adaptatif pour une modulation du processus photosynthétique plus efficace aux basses températures (Hochachka & Somero 1984) chez les plantes provenant du Québec, telle que rapportées antérieurement par Potvin *et al.* (1986) et par Potvin & Simon (1990).

4.3 CHLOROPHYLLE

Potvin *et al.* (1986) ont mesuré la quantité de chlorophylle présente chez les populations QUÉ et MISS d'*Echinochloa crus-galli* acclimatées à des températures de croissance optimales (26/20°C), sous une densité de photon de 1000 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Ils ont obtenu des valeurs de 2,88 mg/l de feuilles pour QUÉ versus 1,42 mg/l de feuilles pour MISS. La concentration chlorophyllienne de QUÉ était dans leur étude deux fois supérieure à celle de MISS, ce qui donne des différences significatives entre les deux populations. Ces différences entre les populations QUÉ et MISS étaient d'autant plus marquées lorsque les plantes étaient soumises à des basses températures de croissance. Comparativement, notre étude fut réalisée aux mêmes températures de croissance (26/20°C) mais sous une densité de photon de 690 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Les quantités de chlorophylle mesurées dans notre étude (QUÉ 3,85 mg/l et MISS 4,42 mg/l) sont supérieures

aux leurs. De plus dans notre étude la concentration de chlorophylle de Mississippi était supérieure à celle de Québec. Toutes les études effectuées antérieurement, dans notre laboratoire avec ces deux mêmes populations, ont démontré que, règle générale, la quantité de chlorophylle des feuilles des plantes de la population QUÉ était supérieure à celle de la population MISS (Potvin *et al.* 1986; Lapointe *et al.* 1989; Hakam & Simon 1997).

4.4 PROPRIÉTÉS THERMIQUES

4.4.1 THERMODÉNATURATION À 47°C

La température de dénaturation varie pour une enzyme donnée d'une espèce à l'autre (Berry & Björkman 1980). La température expérimentale de 47°C choisie lors de notre analyse est intermédiaire comparativement à celle utilisée pour d'autres enzymes du cycle photosynthétique C_4 d'*Echinochloa crus-galli*. La température expérimentale de dénaturation de la NADP-ME était de 40°C (Dubuc *et al.* 1988) alors que celle pour la NAD-MDH et de la NADP-MDH était d'environ 55°C (Simon *et al.* 1984b et Lapointe *et al.* 1989, respectivement). Il n'en demeure pas moins que la phosphoéno/pyruvate carboxylase des extraits de *E. crus-galli* montre une grande sensibilité aux températures élevées. Cette sensibilité aux hautes températures fut d'ailleurs rapportée par d'autres auteurs ayant étudié la PEPC d'autres espèces C_4 (Huber & Edwards 1975; Long *et al.* 1975; Long 1983; Pearcy & Ehleringer 1984). Il est néanmoins surprenant et paradoxal que cette enzyme se dénature rapidement à une température *in vitro* de 47°C alors qu'elle est associée à un système photosynthétique, typique des milieux chauds, capable de tolérer des températures atteignant 60°C (Ludlow 1976) et ayant un pic d'activité maximal autour de 35-45°C. Rathnam (1978) a rapporté que le L-aspartate protégeait la PEPC lors d'une inactivation à la chaleur jusqu'à une température de 55°C. Il semble donc qu'*in situ* la PEPC des plantes C_4 soit protégée par le milieu réactionnel cytosolique. Bien qu'il est reconnu que les plantes C_4 photosynthétisent à des températures allant jusqu'à 60°C mais de façon non-optimale, la température optimale de photosynthèse des plantes C_4 est de 30°C à 40°C. Berry et Björkman (1980) avancent que l'on retrouve le plus souvent une température de thermodénaturation supérieure à la température optimale de

photosynthèse pour une espèce en particulier. C'est le cas pour la PEPC extraite des feuilles d'*Echinochloa crus-galli* puisque la température optimale de photosynthèse de cette espèce est de 30°C (Simon *et al.* 1984b). Robert *et al.* (1983) ont estimé que la faible thermostabilité *in vitro* de la PEPC d'*E. crus-galli* pourrait être attribuée au fait qu'aucune substance protectrice ne fut ajoutée aux extraits lors des essais établis par ces auteurs.

Vroman & Brown (1963) émirent l'hypothèse selon laquelle la thermostabilité des enzymes des populations originaires d'un milieu chaud devrait être supérieure à celle des populations issues d'un milieu plus frais. Cette hypothèse fut confirmée par de nombreuses études rapportées par Alexandrov (1977) qui établit qu'il y avait une corrélation entre la thermostabilité enzymatique des plantes et la température de l'habitat respectif de ces plantes. Ainsi la thermostabilité d'une enzyme devrait s'accroître avec l'adaptation aux milieux chauds. Nos résultats vont de paire avec les principes de modulation thermique de la thermostabilité des enzymes. Une première analyse des valeurs de thermostabilité de la figure VI nous révèle que l'origine des populations influence le degré de thermostabilité de la PEPC chez *Echinochloa crus-galli*. Le fait que les différences entre les populations soient reflétées à chacun des degrés de purification, nous permet d'affirmer que la population MISS possède une thermostabilité plus élevée que la population QUÉ. Nos résultats sont en accord avec ceux obtenus par Simon *et al.* (1984a), qui ont démontré une plus faible thermostabilité de la PEPC provenant des extraits crus de la population QUÉ à 50°C par comparaison à ceux de MISS.

Il n'est donc pas surprenant de constater que la PEPC de la population du MISS soit plus stable à 47°C. Dû au fait qu'elles sont issues d'un milieu chaud, il est logique de supposer que les plantes de la population du Mississippi aient des enzymes mieux préservées vis-à-vis les températures élevées présentes au moment de la saison de croissance. Somero (1978) mentionne que les enzymes d'organismes issus de milieux chauds ont des interactions plus robustes qui leur permettent de conserver une structure tridimensionnelle correcte aux températures élevées. Ainsi des interactions plus rigides accroissent la stabilité

des enzymes envers les hautes températures, mais en contrepartie elles diminuent la flexibilité des enzymes lorsqu'elles sont soumises aux basses températures (Somero 1978), avec une tendance à provoquer un complexe d'agrégation enzymatique aux basses températures.

Dans les cas des plantes C₄, la différenciation génétique des populations se fait des milieux chauds vers les milieux froids. De fait, on peut établir une relation entre la faible thermostabilité de la PEPC de QUÉ et les changements adaptatifs de la structure de l'enzyme pour augmenter sa flexibilité aux basses températures. Des études ont montré qu'aux basses températures il se produisait une réduction des interactions hydrophobiques dans le complexe enzyme—cofacteur, ce qui a comme conséquences une augmentation de l'efficacité catalytique et une meilleure régulation de la sensibilité à basses températures (Somero 1978; Hochachka & Somero 1984). Nos résultats, confirmant ceux obtenus précédemment (Robert *et al.* 1983; Simon *et al.* 1984b), laissent présager qu'une différenciation génétique a eu lieu suite aux pressions sélectives causées par l'environnement de ces plantes issues d'environnements thermiques différents.

Les études antérieures effectuées avec la PEPC non purifiée d'*Echinochloa crus-galli* laissaient un doute concernant le rôle du milieu intracellulaire sur les différences de thermostabilité entre les enzymes de QUÉ et de MISS. Une quantité accrue de protéines et la présence de métabolites secondaires peuvent augmenter la thermostabilité apparente des enzymes (Lyons *et al.* 1979). Simon (1979a) avait constaté des différences dans la thermostabilité de la NAD-malate déshydrogénase chez deux populations de *Lathyrus japonicus* (légumineuse). Ces différences étaient maintenues aux trois différents niveaux de purification, bien que l'enzyme était plus stable *in vivo* que *in vitro*. Ces résultats démontraient aussi que la thermostabilité diminuait avec la purification (Simon 1979a). De plus, la thermostabilité d'une enzyme en solution peut être affectée par des facteurs tels le pH, la composition ionique du milieu, la présence de substrat et d'activateurs et la concentration de l'enzyme (Berry & Bjorkman 1980). Plusieurs études ont démontré que plusieurs des inhibiteurs allostériques de la PEPC (malate, oxaloacétate, aspartate) ont un rôle plus ou moins prononcé de protection

sur l'enzyme PEPC provenant de plantes C₄, bien que la PEPC des plantes C₃ ne semble pas protégée par ces produits lors de la thermodénaturation à hautes températures (Rathnam 1978).

En relation avec le rôle du milieu réactionnel sur la thermostabilité enzymatique, nos résultats ont montré qu'il y avait des différences significatives entre les niveaux de purification des extraits enzymatiques. Mais contrairement à ce qu'on aurait pu s'attendre si l'on se rapporte aux résultats de Simon (1979a) sur la NAD-MDH de *Lathyrus japonicus*, l'extrait cru (Séphadex) n'est pas plus stable que les autres extraits. Effectivement, il fut noté qu'en général les enzymes sont beaucoup plus stables *in vivo* car elles bénéficient de la protection de leur milieu physico-chimique, par contre leur thermostabilité diminue en fonction du degré de purification (Simon 1979b; Berry & Björkman 1980). Bien que l'extrait cru bénéficiait de l'effet résiduel de son milieu physico-chimique intra-cellulaire naturel, l'effet de dilution lors de l'analyse spectrophotométrique (0,05 à 0,10 ml d'extrait dans 2,3 ml de solution d'essai) probablement annule cet effet protecteur.

Nos résultats mettent aussi en évidence l'allure biphasique des courbes de thermodénaturation, soit une dénaturation plus accentuée dans les premières minutes du traitement. Cette particularité fut observée dans plusieurs études antérieures avec plusieurs enzymes incluant la PEPC. Robert *et al.* (1983) ont proposé deux hypothèses explicatives à ce phénomène; la première présume que l'aspect biphasique des courbes serait dû au fait qu'il y aurait deux fractions enzymatiques (isozymes) distinctes dans les extraits (Simon 1979a). La seconde suppose que l'exposition à la chaleur entraînerait des modifications dans la structure physique et les caractéristiques fonctionnelles de l'enzyme qui s'accroîtraient avec le temps du traitement (Dixon et Webb 1979). Nos analyses électrophorétiques montrent un seul isoforme de la PEPC chez les deux populations d'*Echinochloa crus-galli* étudiées, la première hypothèse est donc moins plausible alors que la deuxième apparaît comme étant plus probable.

4.4.2 STABILITÉ À 0°C

L'enzyme PEPC ne subit pas de perte d'activité significative lors d'une immersion de 60 minutes dans un bain à 0°C. Bien que nous n'ayons pas observé de différence entre les populations, nos résultats sont proches de ceux obtenus par Simon (1987) avec l'extrait cru de la PEPC. Dans cette étude antérieure, Simon avait testé *in vitro* l'effet des basses températures (jusqu'à 60 minutes à 0°C) sur l'activité de quatre enzymes du système C₄ (PPDK; PEPC; NADP⁺-MDH et NADP⁺-ME) chez *Echinochloa crus-galli*. Ces résultats ont montré que l'activité de la PEPC du Québec n'était pas affectée par le traitement au froid, ce que notre étude a confirmé. Cependant, leur étude avait révélé que l'activité de la PEPC du Mississippi était significativement plus basse que celle du contrôle respectif après 60 minutes, alors que dans notre étude l'activité de la PEPC de Mississippi n'est pas affectée de façon significative. Les résultats présentés dans l'étude de Simon (1987) montrent des différences entre les populations QUÉ et MISS. Ces différences marginales sont surtout perçues à 20 minutes et 60 minutes de désactivation, mais s'estompent sur l'ensemble des températures. Comparativement cette étude avait aussi démontré que la PPDK des deux populations était affectée par le traitement à 0°C et que l'enzyme du Mississippi était significativement plus affectée que celle du Québec. Cette étude a également démontré que la NADP⁺-MDH et la NADP⁺-ME de la population du MISS d'*Echinochloa crus-galli* montraient une tendance vers des activités résiduelles inférieures de celles de la population QUÉ, par contre ces différences n'étaient statistiquement pas significatives (Simon 1987). Les divergences entre les résultats de Simon (1987) et les nôtres peuvent être dues à des conditions de croissance différentes. Dans l'étude de Simon (1987) à Sydney en Australie, les plantes de QUÉ et de MISS étaient acclimatées dans des serres à une température variant entre 26°C et 29°C (jour), températures de croissance maxima supérieures et moins bien contrôlées que celles de notre étude (26°C).

4.5 PROPRIÉTÉS CINÉTIQUES

4.5.1 ÉNERGIE D'ACTIVATION APPARENTE

L'énergie d'activation apparente (E_a) est corrélée à la quantité d'énergie libre (ΔG^\ddagger) indispensable pour activer les réactions chimiques au niveau du complexe enzyme-substrat (Somero 1978; Simon 1979a). Une faible augmentation des valeurs d' E_a d'un système enzymatique est suffisante pour permettre à un plus grand nombre de molécules de réagir ensemble dans un laps de temps déterminé.

L'énergie apparente d'activation peut être considérée comme une propriété liée aux conditions de l'environnement. Dans cette optique, les analyses de Vroman et Brown (1963) ont démontré que les enzymes des organismes ectothermes adaptés aux climats froids possédaient une énergie d'activation plus basse que celle des organismes adaptés aux climats chauds. Selon ces auteurs, il serait avantageux pour les organismes ectothermes adaptés et/ou acclimatés aux températures froides d'abaisser le niveau d' E_a de leurs enzymes afin de contrebalancer l'apport énergétique extérieur qui est plus faible. De nombreuses études confirment cette hypothèse autant du côté animal (Hochachka & Somero 1973; Somero 1978; Hochachka & Somero 1984) que végétal (McNaughton 1972, 1974; Simon 1979a et c; Simon *et al.* 1984a et b). Toutefois ce phénomène n'est pas général chez les ectothermes. Dans certaines études, la corrélation entre les valeurs d' E_a et la température d'acclimatation et/ou d'adaptation des organismes n'a pu être établie (Hochachka & Somero 1968; Somero & Low 1976; Davidson & Simon 1981).

L'abaissement de l'énergie d'activation de la PEPC des plantes de QUÉ aux basses températures d'essai, déjà observé par Simon *et al.* (1984a) correspond à une baisse des Q_{10} réactionnels. À des températures élevées, l' E_a n'est probablement pas aussi cruciale car l'augmentation de la température ambiante contribue à augmenter l'énergie cinétique dans le système enzymatique. Donc l'ajustement de l' E_a n'est pas aussi critique dans le cas de la PEPC de MISS dans un environnement naturel.

Simon *et al.* (1984a) avaient observé que la population QUÉ avait des E_a (Q_{10} 30°/20°C) pour la PEPC significativement plus bas que la population de MISS. Ces résultats appuyaient l'hypothèse formulée par Vroman et Brown (1963) car la réduction des valeurs de E_a de la PEPC des plantes du QUÉ conférerait une meilleure efficacité catalytique en condition de basses températures. Des différences significatives furent aussi observées par Potvin et Simon (1990) entre ces deux populations où QUÉ avait une valeur de E_a (Q_{10} de 20°/10°C) inférieure à celle de la population MISS. Contrairement à ce que l'on pourrait s'attendre d'après les résultats de ces études antérieures, les résultats obtenus dans la présente étude ne montrent pas de différence dans l'énergie d'activation apparente de la PEPC des plantes du Québec et celles du MISS.

En dépit de l'absence de différence significative entre les deux populations dans notre étude, on remarque toutefois une tendance pour la population QUÉ vers un abaissement de l'énergie d'activation (valeurs d' E_a plus basse pour QUÉ au Q_{10} de 15°/5°C à 25°/15°C). Une analyse de variance factorielle (ANOVA) de l'extrait cru (Séphadex G-25) pour le Q_{10} de 30°/20°C donne un résultat reproduisant ceux obtenus antérieurement par Simon *et al.* (1984a et b). Par contre, en faisant une analyse de variance à mesure répétée (ANOVAR) sur l'ensemble des Q_{10} , cette différence s'estompe et n'est plus significative. Néanmoins, il faut spécifier que les analyses effectuées par Simon *et al.* (1984a et b) étaient réalisées avec des ANOVA ponctuelles ou des t-tests, ainsi nos résultats avec l'extrait cru concordent avec ceux obtenus antérieurement. Il faut aussi souligner que les conditions de croissance des plantes lors des études antérieures diffèrent de celles de notre étude. Les populations furent acclimatées à une thermopériode de 28°/22°C (26°/20°C dans notre étude) et à une photopériode de 14h (16h dans notre étude). Ces différences pourraient expliquer les disparités dans les valeurs ponctuelles des résultats entre ces deux études.

La plupart des paramètres que nous avons analysés dans la présente étude ont démontré qu'il y avait des différences statistiquement significatives entre les

niveaux de purification (activité spécifique, thermodénaturation, stabilité, K_m (PEP), V_{max}/K_m (PEP)). Contrairement à ces paramètres, les courbes d'énergie d'activation apparente pour les trois niveaux de purification sont similaires car nos analyses statistiques ne montrent pas de différences significatives. Ces résultats nous indiquent que pour la PEP, le niveau de purification n'influence pas les valeurs d' E_a et que celles-ci ne seraient pas influencées par les composantes du milieu réactionnel (incluant les produits cytosoliques) dans lequel se retrouvent les extraits lors de leur analyse spectrophotométrique.

4.5.2 LE K_m (PEP) ET LE K_m (Mg^{2+})

La constante de Michaelis-Menten représente l'affinité de l'enzyme pour son substrat. Le patron des valeurs de K_m (PEP) présenté à la figure IX montre que l'affinité de l'enzyme pour son substrat augmente suivant l'augmentation de la température d'essai. Par contre on constate une augmentation des valeurs aux températures supérieures à 35°C, cette augmentation étant probablement due au fait qu'à ces températures d'essai l'enzyme commence à se dénaturer sous des conditions *in vitro* (Simon *et al.* 1984a).

Il a été démontré *in vitro* que le K_m des enzymes d'organismes ectothermes pouvait varier en quelques secondes en réponse à une modification de température du milieu ambiant (Somero & Hochachka 1976; Somero 1978). C'est cette compensation immédiate à la température que l'on nomme modulation thermique et, si elle a lieu, peut prendre deux voies différentes. Lorsque l'affinité enzyme-substrat (E-S) augmente aux faibles températures, il est question de modulation thermique positive (Hochachka & Somero 1984). D'après Hochachka & Somero (1984), la hausse de K_m (faible affinité E-S) agit de paire avec une baisse de l'énergie cinétique, conséquemment avec une hausse des Q_{10} réactionnels. À l'inverse, si l'affinité E-S diminue avec les faibles températures, il s'agit d'une modulation thermique négative (Hochachka & Somero 1984). Hochachka et Somero (1984) expliquent ce fait (deux réponses opposées selon l'enzyme, face à un même agent externe) par la différence dans le type de liaisons faibles impliquées au niveau des sites actifs de l'enzyme.

Nos résultats indiquent que les K_m (PEP) de la PEPC suivent le modèle d'une modulation thermique négative confirmant ainsi les résultats obtenus sur six populations d'*Echinochloa crus-galli* (Simon *et al.* 1984b). Cette modulation thermique négative n'est pas souvent signalée dans la littérature (Hochachka & Somero 1973; Simon *et al.* 1984b) alors que l'inverse est plus courant (Dubuc *et al.* 1988; Simon *et al.* 1989b). En effet, une modulation thermique positive représente une stratégie qualitative immédiate de réponse métabolique (Hochachka & Somero 1984), alors qu'une modulation thermique négative peut avoir des conséquences désastreuses sur le métabolisme aux basses températures ambiantes. Dans le cas de la PEPC, les conséquences de la modulation thermique négative ont moins d'importance pour les espèces des milieux chauds car il faut prendre en considération que la PEPC des plantes C_4 est une enzyme adaptée aux températures élevées. Par contre, cette modulation thermique négative pourrait être une barrière à l'adaptation des enzymes des plantes C_4 vers des milieux plus froids s'il n'y a pas de compensation pour diminuer les K_m aux basses températures.

Nos résultats démontrent que les températures d'essai affectent les K_m de la PEPC d'*E. crus-galli*. Ainsi, nous avons observé que l'affinité E-S (PEP) varie en fonction de la température d'essai. Suite à des études sur les effets de la température sur l'affinité enzyme-substrat, Somero et Hochachaka (1976) ont observé que de façon générale, ni l'acclimatation, ni l'adaptation au froid n'ont mené à la sélection d'enzymes possédant des K_m plus bas que celles d'individus semblables adaptés aux milieux chauds. En dépit de cette constatation, nous avons noté des différences significatives pour les valeurs de K_m (PEP) entre la PEPC des deux écotypes. Ces différences pourraient être attribuées à un changement adaptatif de cette propriété catalytique qu'est le K_m . Nos résultats indiquent qu'à basses températures d'essai les valeurs de K_m (PEP) des extraits des plantes du Mississippi sont pratiquement le double de celles des plantes du Québec suggérant ainsi un net avantage pour l'enzyme extraite de la population québécoise à mieux performer dans un milieu froid.

Nos résultats sont en accord avec les arguments d'Hochachka et de Somero (1984) qui stipulent que les organismes ectothermes soumis à des températures froides développent des systèmes enzymatiques ayant un K_m optimum aux températures d'adaptation comblant ainsi le faible apport énergétique du milieu. Malgré le fait que les différences sont maintenues pour les trois degrés de purifications, les analyses indiquent qu'il y a aussi des différences au niveau des purifications ce qui indique que le milieu réactionnel dans lequel se retrouvent l'enzyme non purifiée et partiellement purifiée aurait un effet sur l'affinité pour le substrat. La figure XI montre en effet que les valeurs des K_m (PEP) pour les extraits crus (Séphadex G-25) sont significativement plus basses que celles des autres niveaux de purification. Plusieurs auteurs ont démontré en effet l'influence de divers acides C_4 (malate, aspartate) sur certaines propriétés des enzymes C_4 (Paleg *et al.* 1981; Krall *et al.* 1989). De plus, des études ont démontré que le PEG avait un rôle de protection et même d'activation sur les enzymes (Lee & Lee 1979; Reinhart 1980; Paleg *et al.* 1984; Selinioti *et al.* 1987). Bien que la plupart de ces études traitent du rôle du PEG et des acides C_4 sur la thermodénaturation et la stabilité aux basses températures des enzymes, Reinhart (1980) a rapporté qu'une concentration adéquate de le PEG influence positivement les valeurs de K_m de la phosphofructokinase extraite du foie de rat. Selinioti *et al.* (1987) ont mentionné les effets de divers sucres et du PEG sur certaines propriétés catalytiques de la PEPC dont le K_m .

Nos résultats montrent que l'affinité enzyme-cofacteur (Mg^{2+}) (E-Cf) varie en fonction de la température. L'affinité E-Cf augmente en fonction de la température avec les extraits crus et cette affinité E-Cf diminue avec les extraits partiellement et totalement purifiés. Ce qui indique que dans le cas du K_m (Mg^{2+}) on observe une modulation thermique positive pour les extraits partiellement purifiés et purifiés, alors que pour les extraits crus, on dénote une modulation thermique négative. Les analyses de Simon *et al.* (1984b) avec des extraits non purifiés (Séphadex G-25) avaient aussi démontré une augmentation de l'affinité E-Cf en fonction des températures d'essai, mais contrairement à nos résultats, ces auteurs avaient noté une différence significative entre les deux populations. La discordance entre les résultats selon leur degré de purification semble indiquer que

le milieu dans lequel l'enzyme se retrouve joue une grande influence sur l'affinité de l'enzyme pour son co-substrat magnésium.

L'absence de différences significatives entre les K_m (Mg^{2+}) de Québec et de MISS pour les extraits crus suggère que la concentration intracellulaire du magnésium serait suffisante pour moduler la cinétique de la PEPC sur une amplitude thermique importante. Par contre, nos analyses ont aussi démontré une absence de différences significatives entre les K_m (Mg^{2+}) de Québec et de MISS pour les extraits purifiés.

4.5.3 LA VITESSE MAXIMALE V_{MAX} ET LE RAPPORT V_{MAX}/K_M

La variation des valeurs de vitesse maximale réactionnelle donne un indice de la variation de la concentration enzymatique (Somero 1978). D'après Hochachka & Somero (1984) la température peut affecter de diverses façons la V_{max} réactionnelle. Par exemple elle peut modifier le pH cellulaire, ce qui occasionnera une augmentation ou une diminution de la vitesse réactionnelle. La température peut aussi influencer la concentration de différents métabolites ou celle du substrat ce qui affectera directement la vitesse.

Pour les deux populations, les valeurs de la V_{max} réactionnelle (PEP) augmentent en fonction de la température. Mais malgré l'absence de différences significatives entre les deux populations on observe que la population QUÉ tend vers des valeurs supérieures de V_{max} comparativement à la population MISS. Pour ce paramètre ainsi que pour le ratio V_{max}/K_m , on note un écart important entre les valeurs de la purification partielle (PEG) et celles des deux autres purifications. Les valeurs de V_{max} pour le PEG sont près du double des valeurs des extraits crus et purifiés. Il est reconnu que le polyéthylène glycol a un rôle de protection et de stabilisation sur les enzymes (Lee & Lee 1979; Reinhart 1980; Paleg *et al.* 1984; Selinioti *et al.* 1987), ce qui pourrait expliquer en grande partie les écarts de valeurs observées. Reinhart (1980) rapporte que de faibles concentrations de PEG (inférieure au point de précipitation) protégeaient la phosphofructokinase en ralentissant son inactivation spontanée et des concentrations plus élevées de PEG

(égale ou supérieure au point de précipitation) avaient un effet d'activation sur l'enzyme.

L'utilisation du rapport V_{\max}/K_m ("kinetics power") s'avère une meilleure estimation du rapport K_{cat}/K_m (de l'efficacité catalytique) que le K_m seul (Crowley, 1975; Hall & Koenh, 1983; Fersht 1985). Ce paramètre est d'autant plus utilisé qu'il permet l'analyse des enzymes non purifiées, alors que le K_{cat} exige une enzyme purifiée.

La figure X montre que les rapports V_{\max}/K_m (PEP) pour l'extrait cru QUÉ sont significativement supérieurs à ceux du MISS. Nos résultats concordent avec ceux rapportés antérieurement par Potvin & Simon (1990) pour les basses températures d'essais, où la population QUÉ avait des rapports V_{\max}/K_m (PEP) supérieurs. Par contre aux températures d'essais plus élevées, Potvin et Simon (1990) ont rapporté des rapports V_{\max}/K_m (PEP) supérieurs chez la population MISS. De plus, les études de Simon *et al.* (1984b) réalisées avec la PEPC (non purifiée) extraite de six populations d'*Echinochloa crus-galli* ont montré que l'enzyme présentait des rapports de V_{\max}/K_m supérieurs chez les plantes adaptées au froid, comparativement à celles provenant des climats chauds.

Nonobstant la tendance pour la PEPC de la population QUÉ à présenter un rapport V_{\max}/K_m (PEP) supérieur à celui de la population MISS, l'absence de différence significative entre les populations pour les extraits partiellement purifiés et purifiés suggère qu'il n'existe pas de mécanismes augmentant l'efficacité catalytique de la PEPC QUÉ aux basses températures. Toutefois les extraits crus indiquent le contraire, ainsi un rapport V_{\max}/K_m plus élevé indique une augmentation de l'efficacité catalytique de la PEPC de la population du Québec. Ce qui serait un avantage pour la population QUÉ croissant dans un environnement plus frais et subissant des variations de températures de plus grande amplitude que celle du MISS (Potvin & Strain 1985).

Les rapports V_{\max}/K_m (Mg^{2+}) de la PEPC ne diffèrent pas en fonction de la population ni en fonction de la purification, ce qui n'est pas étonnant vu l'absence

de différences pour le K_m (Mg^{2+}) et le V_{max} (Mg^{2+}) (données non rapportées) entre les populations et entre les niveaux de purification.

4.5.4 LE POUVOIR CATALYTIQUE : K_{CAT}

Plus précis que le rapport V_{max}/K_m , le K_{cat} est considéré comme le meilleur descripteur de l'efficacité catalytique d'une enzyme (Fersht 1985). Dans cette étude, le K_{cat} ne fut calculé que pour les extraits purifiés car il faut tenir compte de la concentration molaire (E) de l'enzyme, qui est impossible de calculer pour les extraits crus et partiellement purifiés à cause de la présence d'autres protéines (Somero 1978; Hall & Koehn 1983; Fersht 1985). Lors d'analyses cinétiques avec des enzymes purifiées, la détermination du K_{cat} s'avère utile, voir essentielle pour comprendre l'adaptation des enzymes à un environnement spécifique. Des analyses de cinétique avec un extrait cru ou partiellement purifié peuvent souvent induire en erreur (Hall & Koehn, 1983). Le K_{cat} s'avère un paramètre de la cinétique utile pour mesurer les modifications dans l'activité moléculaire de l'enzyme. En effet, ce paramètre exprime la vitesse de la catalyse de l'enzyme depuis la formation du complexe E-S, la formation du produit, la libération de l'enzyme et son retour à la réaction de départ. Contrairement au K_m , une valeur élevée du K_{cat} indique un plus grand pouvoir catalytique de l'enzyme. Donc, plus la valeur du K_{cat} est élevée, meilleure est l'efficacité de l'enzyme pour catalyser une réaction. Nos résultats indiquent qu'il y a des différences significatives entre les deux populations au niveau des K_{cat} . Par contre des tests d'ANOVAR tenant compte séparément des basses et des hautes températures (c.-à.-d. de 5°C-20°C et 25°C-40°C) indiquent que les différences sont uniquement perçues pour les températures élevées. En effet, aux basses températures, il n'y a pas de différences significatives, les valeurs étant trop basses et les écarts types correspondants relativement plus importants. Ces résultats nous indiquent qu'il y a donc des différences entre les deux populations, mais que ces différences sont occasionnées par les différences observées entre les populations aux températures supérieures à 20°C. Ces résultats laissent sous-entendre que la PEPC de la population du Mississippi possède une meilleure efficacité catalytique aux hautes températures, sans toutefois signaler une tendance physiologique vers

une efficacité catalytique accrue de la PEPC du Québec aux basses températures d'essai.

4.6 CONSIDÉRATION GÉNÉRALE

Ce qui fait une des particularités de cette étude, c'est que tout en comparant deux populations issues de milieux contrastants d'un point de vue adaptatif, elle compare aussi l'effet du degré de purification de l'enzyme sur cette adaptation.

Premièrement nous avons observé que les différences dans certaines des propriétés de la PEPC entre les populations étudiées sont maintenues quelque soit le niveau de purification. Néanmoins ces différences entre les populations sont quelques peu surprenantes car la PEPC n'est pas une enzyme limitante dans le système, elle se trouve même en surabondance. Les études réalisées par Simon *et al.* (1984b) et Potvin et Simon (1990) ont déterminé que la concentration d'enzyme [E] PEPC des feuilles d'*Echinochloa crus-galli* était de 5 à 1,5 fois plus abondante que celle nécessaire au processus photosynthétique des plantes dans des conditions environnementales correspondantes. Mais il ne faut pas oublier que dans notre étude, les conditions de croissance ne sont pas représentatives des conditions de pression sélective rencontrées dans l'habitat naturel d'*Echinochloa crus-galli*. Il est possible que sous différentes conditions et/ou combinaisons de facteurs environnementaux, abiotiques et biotiques, la PEPC puissent devenir limitante (Simon *et al.* 1984a). La complexité des phénomènes de régulation de cette enzyme impliquent que son fonctionnement est plus limitant que sa concentration ne le laisserait supposer (Chollet *et al.* 1996).

Deuxièmement, tout au long de nos résultats nous avons observé des différences entre les purifications pour la plupart des paramètres analysés. Ainsi, lorsque l'on compare les purifications entre elles, on constate que plusieurs différences observées entre les populations pour les extraits crus sont reproduites aux deux autres niveaux de purification. Néanmoins, on constate que les différences aux niveaux de la cinétique de la PEPC, entre les populations QUÉ et

MISS, tendent à s'estomper lorsque l'enzyme est purifiée. On peut affirmer que malgré le fait que des différences entre les populations sont maintenues avec l'augmentation de la purification, c'est au niveau de l'enzyme cru et partiellement purifiée que ces différences suggèrent le mieux le phénomène d'adaptation.

Les auteurs s'entendent difficilement sur le degré de purification d'une enzyme lors d'analyse visant à mieux comprendre le phénomène d'adaptation et d'acclimatation des populations. Certains, les enzymologistes, prônent la purification complète de l'enzyme pour éliminer l'influence du milieu cellulaire, alors que d'autres, les écologistes, préfèrent utiliser des extraits très peu purifiés afin justement de conserver un peu du milieu cellulaire dans lequel se retrouve l'enzyme à l'état naturel. Mais en contrepartie, l'extrait cru est peut-être très éloigné des conditions *in situ* cellulaires car il est soumis à des pH et à des concentrations de métabolites *in vitro* qui ne reflètent pas toujours la situation *in situ* cellulaire. De plus la compartimentalisation cellulaire, essentielle aux réactions *in vivo*, est détruite lors de l'extraction.

Notre étude a justement démontré qu'il y avait des différences dans les résultats selon le niveau de purification de l'enzyme. Si l'on se place d'un point de vue purement écologique, il y a des différences entre les extraits crus des deux populations pour les paramètres les plus pertinents (thermodénaturation, K_m , V_{max}/k_m). Ce qui suggère un phénomène d'adaptation de la part des populations QUÉ et MISS face à leur milieu d'origine. Si l'on suit l'avis des enzymologistes, on observe des différences au niveau de la PEPC purifiée pour quelques paramètres (K_m et K_{cat}) et des tendances de différenciation, statistiquement non significatives, pour les autres paramètres. Ce qui laisse entrevoir un phénomène d'adaptation très peu prononcé et moins explicable dans un contexte d'environnement thermique.

On peut comprendre qu'une analyse faite à partir d'une enzyme très peu purifiée tient compte en partie du milieu intracellulaire dans lequel se retrouve l'enzyme en question, bien que lors des essais ce résidu du milieu intracellulaire se retrouve grandement dilué dans la solution tampon. Le processus adaptatif peut

avoir favorisé une plus forte concentration de certains composés qui protègent l'enzyme et favorisent son efficacité catalytique dans un environnement donné. Alors qu'une étude réalisée avec une enzyme purifiée tient compte des modifications dans la structure même de l'enzyme, soit dans sa composition en acides aminés, dans sa structure quaternaire ou dans la séquence correspondante au site actif de l'enzyme. Néanmoins, on est en droit de constater que, dans notre étude, le phénomène d'adaptation est plus perceptible et explicable au niveau des enzymes partiellement purifiées (PEG 13%). Résultat singulier, car il s'agit d'un extrait enzymatique à mi-chemin entre les deux extrêmes. Ces extraits, débarrassés de plusieurs composés de bas poids moléculaires, contiennent du polyéthylène glycol qui semble avoir protégé différemment la PEPC de QUÉ et celle de MISS, la rendant moins sensible que l'enzyme hautement purifiée tout en éliminant certaines composantes du milieu cellulaire naturel présent dans les extraits crus.

Les deux façons d'étudier les enzymes sont convenables, malheureusement on peut obtenir des résultats moins prononcés à mesure que l'on augmente le niveau de purification, d'où l'importance de faire une comparaison entre différents degrés de purification.

Chapitre V

Conclusion

L'interprétation de nos résultats suggère qu'il y a un processus d'adaptation aux basses températures chez l'éco-type du Québec. L'ensemble de cette étude nous permet d'analyser certaines propriétés thermiques et cinétiques de la PEPC d'*Echinochloa crus-galli*, et ce, dépendamment de son degré de purification. Les résultats rapportés dans ce mémoire nous ont permis de constater l'absence de différences majeures dans la structure de la PEPC des deux populations. D'autre part, on note des différences aux niveaux des propriétés thermiques et cinétiques de cette enzyme en relation avec son origine. La constante de Michaelis-Menten, le pouvoir catalytique ainsi que la thermodénaturation à 47°C suggèrent que la PEPC de la population du Québec est plus efficace aux basses températures alors que la PEPC de la population du Mississippi est plus efficace aux températures élevées.

Les études de structures moléculaires faites avec la PEPC purifiée nous ont révélé premièrement que nous avons bien isolé la PEPC et deuxièmement qu'il n'y avait pas de différence dans le poids moléculaire et dans la structure même de l'enzyme en fonction de la population: les deux ayant la même mobilité électrophorétique et un point isoélectrique similaire.

Des différences sont apparues au niveau de la thermodénaturation enzymatique. L'enzyme extraite de la population Mississippi s'est avérée plus thermostable que celle du Québec. De plus, l'analyse des K_m (PEP) révèle que la population QUÉ possède une meilleure affinité pour son substrat, et ce, surtout aux basses températures.

Le fait que les différences entre les populations soient maintenues à chaque niveau de purification indique que ces différences sont belles et biens liées à l'enzyme et non pas occasionnées uniquement par le milieu dans lequel se retrouve l'enzyme non purifiée. Les différences nombreuses entre les purifications laissent sous-entendre que les niveaux de purification influencent l'intensité des réponses. Les extraits partiellement purifiés semblent être protégés par le polyéthylène glycol, ce qui leur confère souvent des valeurs nettement supérieures aux paramètres cinétiques analysés par rapport aux deux autres niveaux de purification.

Les différences dans certaines propriétés thermiques et cinétiques, entre les populations Québec et MISS, suggèrent que certaines propriétés cinétiques et thermiques de la PEPC de ces populations d'*Echinochloa crus-galli* auraient été modifiées en fonction des conditions thermiques retrouvées sur les lieux d'origine de la population.

Références

- Alexandrov, V.Y.A.** (1977). Cells, Molecules and Temperature. Conformational Flexibility of Macromolecules and Ecological Adaptation. Ecological Studies Vol 21. 330p.
- Arrio-Dupont, M. Bakrim, N. Echevarria, C. Gadal, P. Le Maréchal, P. Vidal, J.** (1992). Compared properties of phosphoenolpyruvate carboxylase from dark- and light- adapted *Sorghum* leaves: use of a rapid purification technique by immunochromatography. — *Plant Sci.* **81**: 37-46.
- Ashton, A.R., Burnell, J.N., Furbank, R.T., Jenkins, C.L.D., & Hatch, M.D.** (1990). Enzymes of C₄ photosynthesis. Dans: *Methods in Plant Biochemistry*. Vol. 3. Ed. P.J. Lea., Academic Press, London pp.39-72.
- Ausenhuis, S.L. & O'Leary, M.H.** (1992). Hydrolysis of phosphoenolpyruvate catalyzed by phosphoenolpyruvate carboxylase from *Zea mays*. — *Biochemistry* **31**:6427-6431.
- Bakrim, N., Echevarria, C., Crétin, C., Arrio-Dupont, M., Pierre, J.-N., Vidal, J., Chollet, R. & Gadal, P.** (1992). Regulatory phosphorylation of *Sorghum* leaf phosphoenolpyruvate carboxylase. — *Eur. J. Biochem.* **204**: 821-830.
- Barrett, S.C.H. et Wilson, B.F.** (1981). Colonizing ability in the *Echinochloa crus-galli* complex (barnyard grass). I. Variation in life history. — *Can. J. Bot.* **59**: 1844-1860.
- Berrie, A.M.M.** (1977). The Gramineae : The Grasses. Dans: *Introduction to the botany of the major crop plants*. Heyden & Son Ltd. pp. 1-34.
- Berry, J., & Björkman, O.** (1980). Photosynthetic response and adaptation to temperature in higher plants. — *Ann. Rev. Plant Physiol.* **31**: 491-543.
- Bradford, M.M.** (1976). A Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. — *Anal. Biochem.* **72**: 248-254.
- Bradshaw, A.D.** (1965). Evolutionary significance of phenotypic plasticity in plants. — *Adv. Genet.* **13**: 115-155.
- Bradshaw, A.D.** (1972). Some of the evolutionary consequences of being a plant. — *Evol. Biol.* **5**: 25-47.
- Bruinsma, J.** (1963). The Quantitative analysis of chlorophylls α and β in plant extracts. — *Photochem. and Photobiol.* **2** : 241-249.
- Budde, R.J. & Chollet, R.** (1986). *In Vitro* phosphorylation of maize leaf phosphoenolpyruvate carboxylase. — *Plant Physiol.* **82**: 1107-1114.
- Cambell, W.H. & Black, C.C.** (1982). Cellular aspects of C₄ leaf metabolism. Dans: *Cellular localisation in plant metabolism*. Recent advances in phytochemistry. L.L. Creasy et G. Hrazdina eds. Plenum Press N.Y. vol **16**, pp: 223-248.
- Chapel, T., Iglesias, L., Barreto, A., Baisre, F. & Simon, J.-P.** (1974). Simplified apparatus for vertical slab electrophoresis in polyacrylamide gels. — *Laboratory Pratices* **23**: 311-312.
- Chollet, R. Vidal, J. & O'Leary, M.H.** (1996). Phosphoenolpyruvate carboxylase: a ubiquitous, highly regulated enzyme in plants. — *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **47**: 273-298.

- Collins, R.P. et Jones, M.B.** (1985). The influence of climatic factors on the distribution of C₄ species in Europe.—*Vegetatio* **64**:121-129.
- Crowley, P.H.** (1975). Natural selection and the Michaelis constant.—*J. Theor. Biol.* **50**: 455-461.
- Davidson, D. & Simon, J.-P.** (1981). Thermal adaptation and acclimatation of ecotypic populations of *Spirodela polyrhiza* (Lemnaceae): thermostability and apparent activation energy of NAD malate dehydrogenase.—*Can. J. Bot.* **8**: 1061-1068.
- Dixon, M et Webb, E.C.** (1979). *Enzymes*. 3^e édition. Academic Press. New-York. 1116 p.
- Dubuc, M., Lapointe, L. & Simon, J.-P.** (1988). Kinetic properties of NADP-malic enzyme in two populations of the C₄ weeds species *Echinochloa crus-galli* (L.) Beauv. (Poaceae) from sites of contrasting climates. — *Funct. Ecol.* **2**: 353-362.
- Edwards G.E., Ku, M.S.B. & Hatch M.D.** (1982). Photosynthesis in *Panicum milioides*, a species with reduced photorespiration. — *Plant & Cell Physiol.* **23**: 1185-1195
- Ehleringer, J.R., Sage, R.F., Flanagan, L.B. & Pearcy, R.W.** (1991). Climate change and evolution of C₄ photosynthesis. —*Trends Ecol. Evol.* **6**: 95-99.
- Ehleringer, J.R. & Monson, R.K.** (1993). Evolutionary and ecological aspects of photosynthetic pathway variation. — *Annu. Rev. Ecol. Syst.* **24**: 411-439.
- Ehleringer, J.R., Cerling, T.E. & Helliker, B.R.** (1997). C₄ photosynthesis, atmospheric CO₂, and climate. — *Oecologia* **112**: 285-299.
- Fersht, A.** (1985). *Enzyme structure and mechanism* 2nd edition. W.H. Freeman and company, New-York. 475.
- Gavalas, N.A., Caravatas, S. & Manetas, Y.** (1981). Sigmoid rate curves of photosynthetic (C₄) PEP carboxylase as an artifact of the assay: Factors affecting inactivation reactivation of the enzyme. Dans: *Photosynthesis*, Vol 4, Akoyunoglou, G. (ed). Balaban International Sciences Services, Philadelphia. pp 91-98.
- Gould, F.W., Ali, M.A. & Fairbrother. D.E.** (1972). A review of *Echinochloa* in the United States. —*The Amer. Midl. Nat.* **87**: 36-59
- Gupta, S.K., Ku, M.S.B., Lin, J.-H., Zhang, D. & Edwards, G.E.** (1994). Light/dark modulation of phosphoenolpyruvate carboxylase in C₃ and C₄ species. — *Photos. Res.* **42**: 133-143.
- Hakam, N. & Simon, J.-P.** (1997). Protective system against photoreduced species of dioxygen in two population of the C₄ grass *Echinochloa crus-galli* (barnyard grass; Poaceae) originating from contrasting climatic regions. — *Can. J. Bot.* **75**: 310-319.
- Hall, J.G. & Koehn, R.K.** (1983). The Evolution of Enzyme Catalytic Efficiency and Adaptive Inference from Steady-State Kinetic Data. — *Evol. Biol.* **16**: 54-96.
- Hatch, M. D. et Slack, C.R.** (1970). Photosynthetic CO₂-fixation pathways.— *Ann. Rev. Plant Physiol.* **21**: 141-162.
- Hatch, M. D. et Burnell, J.** (1990). Carbonic Anhydrase Activity in Leaves and its Role in the First Step of C₄ Photosynthesis.— *Plant Physiol.* **93**: 825-828.
- Hattersley, P.W.** (1983). The distribution of C₃ and C₄ grasses in Australia in relation to climate.— *Oecologia* **57**: 113-128.
- Heslop-Harrison, J.** (1964). Forty years of geneecology. — *Adv. Ecol. Res.* **2**: 159-247.

- Hitchcock, A.S.** (1971). *Manual of the Grasses of the United States*. Dover, New-York. 1040p.
- Hochachka, P.W. & Somero, G.N.** (1968). The adaptation of enzymes to temperature.— *Comp. Biochem. Physiol.* **27**: 659-668.
- Hochachka, P.W. & Somero, G.N.** (1973). *Strategies of Biochemical Adaptation*. W.B. Saunders Co. Philadelphia. 358p.
- Hochachka, P.W. & Somero, G.N.** (1984). *Biochemical Adaptation*. Princeton University Press, Princeton N.J. pp:377-422.
- Holm, L.G., Plucknett, D.L., Pancho, J.V. et Herberger, J.P.** (1977). *The World's Worst Weeds: Distribution and Biology*. (Chapitre 3) Univ. Press Hawaiï. Honolulu. pp 32-40.
- Horton, H.R., Moran, L.A. Ochs, R.S. Rawn, J.D. & Scrimgeour, K.G.** (1993). Amino acids and the primary structures of proteins. (Chapître 3). Dans: *Principles of Biochemistry*. Neil Patterson Publishers, Prentice Hall. New-Jersey.
- Huber, S.C. & Edwards, G.E.** (1975). Inhibition of phosphoenolpyruvate carboxylase from C₄ plants by malate and aspartate. — *Can. J. Bot.* **53**: 1925-1933.
- Huber, S.C. & Sugiyama, T.** (1986). Changes in sensitivity to effectors of maize leaf phosphoenolpyruvate carboxylase during light/dark transition. — *Plant Physiol.* **81**: 674-677.
- Hull, M. R., Long, S. P., Jahnke, L.S.** (1997). Instantaneous and Developmental Effects of Low Temperature on the Catalytic Properties of Antioxidant Enzymes in Two *Zea* species. — *Aust. J. Plant Physiol.* **24**:337-343.
- Jiao, J.-A. et Chollet, R.** (1988). Light/Dark regulation of maize leaf phosphoenolpyruvate carboxylase by *in vivo* phosphorylation. — *Arch. Biochem. Biophys.* **261**: 409-417
- Jones, R., Wilkins, M.B., Coggings, J. R., Fewson, C.A., Malcolm, A.D.B.** (1978). Phosphoenolpyruvate carboxylase from the Crassulacean plant *Bryophyllum fedtschenkoi*. — *Biochem. J.* **175**: 391-406.
- Kärn, R.C., Kivic, P.A. & Hudock, G.A.** (1973). A procedure for the electrophoretic analysis of phosphoenolpyruvate carboxylase. — *Biochim. Biophys. Acta* **293**: 567-569.
- Keleti, T., & Welch, G.R.** (1984). The evolution of enzyme kinetic power. — *Biochem. J.* **223**: 299-303.
- Karabourniotis, G., Manetas, Y. et Gavalas, N.A.** (1983). Photoregulation of phosphoenolpyruvate carboxylase in *Salsola soda* L. and other C₄ plants. — *Plant Physiol.* **73**: 735-739.
- Krall, J.P., Edwards, G.E. et Andreo, C.S.** (1989). Protection of Pyruvate, P_i Dikinase from Maize against Cold Lability by Compatible Solutes. — *Plant Physiol.* **89**: 280-285.
- Laemmli, U.K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. — *Nature* **227**: 680-685.
- Langlet, O.** (1963). Patterns and terms of intra-specific ecological variability. — *Nature* **200**: 347-348.
- Lapointe, L., Dubuc, M.C., Vairinhos, F. & Simon, J.-P.** (1989). Thermal effects on kinetic properties of NADP⁺-malate dehydrogenase in two ecotypes of the C₄ grass weed *E. crus-galli* (L.) Beauv. from sites of contrasting climates. — *Funct. Ecol.* **3**: 709-717.

- Lee, J.C. et Lee, L.L.Y.** (1979). Interaction of Calf Brain Tubulin with Poly(ethylene glycols). — *Biochemistry* **18**: 5518-5526.
- Lepiniec, L., Keryer, E., Tagu, D., Gadal, P. & Créatin C.** (1992). Complete nucleotide sequence of a *Sorghum* gene coding for the phosphoenolpyruvate carboxylase involved in C₄ photosynthesis. — *Plant Mol. Biol.* **19**: 339-342.
- Lepiniec, L., Keryer, E., Philippe, H., Gadal, P. & Créatin C.** (1993). *Sorghum* phosphoenolpyruvate carboxylase: structure, function and molecular evolution. — *Plant Mol. Biol.* **21**: 487-502.
- Lepiniec, L., Vidal, J., Chollet, R., Gadal, P. & Créatin C.** (1994). Phosphoenolpyruvate carboxylase: structure, regulation and evolution. — *Plant Sci.* **99**: 111-124.
- Lewontin, R.C.** (1974). *The genetic basis of evolutionary change*. Columbia University Press. 346p.
- Long, S.P., Incoll, L.D. & Woolhouse, H.W.** (1975). C₄ photosynthesis in plants from cool temperate regions, with particular reference to *Spartina townsendii*. — *Nature* **257**: 622-624.
- Long, S.P.** (1983). C₄ Photosynthesis at low temperatures. — *Plant, Cell Environ.* **6** :345-363.
- Low, P.S., Bada, J.L. et Somero, G.N.** (1973). Temperature adaptation of enzymes: roles of the free energy, the enthalpy, and the entropy of activation. — *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* **70**: 430-432.
- Ludlow, M.M.** (1976). Ecophysiology of C₄ grasses. — *Ecological Studies* **19**: 364-396.
- Lyons, J.M., Graham, D. et Raison, J.K.** (1979). *Low Temperature Stress in Crop Plants. The role of the membrane*. Academic Press, N.Y., 565 p.
- Maruyama, H., Easterday, R. L., Chang, H. C., Lane, M.D.** (1966). Purification properties of phosphoenolpyruvate carboxylase from the germinating peanut cotyledon. — *J. Biol. Chem.* **241**: 2405-2412.
- Marie-Victorin, E.C.** (1964). *Flore Laurentienne*. 2^{ème} édition. Presse de l'Université de Montréal. 926p.
- McNaughton, G.A.L., Fewson, C.A. Wilkins, M.B. & Nimmo, H.G.** (1989). Purification, oligomerization state and malate sensitivity of maize leaf phosphoenolpyruvate carboxylase. — *Biochem. J.* **261**:349-355.
- McNaughton, S.J.** (1972). Enzymic thermal adaptations. The evolution of homeostasis in plants. — *Amer. Nat.* **106**: 165-172.
- McNaughton, S.J.** (1974). Natural selection at the enzyme level. — *Amer. Nat.* **108**: 616-624.
- Mizioroko, H. M., Nowak, T., Mildvan, A.S.** (1974). Spinach leaf phosphoenolpyruvate carboxylase: Purification, properties, and kinetic studies. — *Arch. Biochem. Biophys.* **163**: 378-389.
- Nelson, T. & Langdale, J.A.** (1992). Developmental genetics of C₄ photosynthesis. — *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **43**:25-47.
- O'Farrell, P.H.** (1975). High Resolution Two-Dimensional Electrophoresis of Proteins — *J. Biol. Chem.* **250** (10) :4007-4021.

- O'Leary, M.H.** (1982). Phosphoenolpyruvate carboxylase: An enzymologist's view. — *Ann. Rev. Plant Physiol.* **33**:297-315.
- Öquist, G.** (1983). Effects of low temperature on photosynthesis. — *Plant Cell Environ.* **6**: 281-300.
- Paleg, L.G., Douglas, T.J., van Paal, A. et Keech, D.B.** (1981). Proline, betaine, and other organic solutes protect enzymes against heat inactivation. — *Aust. J. Plant Physiol.* **8**: 107-114.
- Pearcy, R.W., Tumosa, N. & Williams, K.** (1981). Relationships between growth, photosynthesis and competitive interactions for a C₃ and C₄ plant — *Oecologia* **48**: 371-376.
- Pearcy, R.W. & Ehleringer, J.** (1984). Comparative ecophysiology of C₃ and C₄ plants. — *Plant Cell Environ.* **7**: 1-13.
- Potvin, C.** (1986). Biomasse allocation and phenological differences among southern and northern populations of the C₄ grass *Echinochloa crus-galli*. — *J. Ecol.* **74**: 915-923.
- Potvin, C. et Strain, B.** (1985). Effects of CO₂ enrichment and temperature on growth in two C₄ weeds, *Echinochloa crus-galli* and *Eleusine indica*. — *Can. J. Bot.* **63** : 1495-1499.
- Potvin, C. Simon, J.-P. & Strain, B.R.** (1986). Effect of low temperature on the photosynthetic metabolism of the C₄ grass *Echinochloa crus-galli*. — *Oecologia* **69**: 499-506.
- Potvin, C., & Simon, J.-P.** (1990). The evolution of cold temperature adaptation among populations of a widely distributed C₄ weed: Barnyard grass. — *Evol. Trends Plants* **3**: 98-105.
- Potvin, C., Lechovicz, M.J. & Tardif, S.** (1990). The Statistical Analysis of Ecological Reponse Curves obtained from Repeated Measurements.— *Ecology* **71**: 1389-1400.
- Rajagopalan, A.V., Tirumala, M. & Raghavendra, A.S.** (1994). Molecular biology of C₄ phosphoenolpyruvate carboxylase: Structure, regulation and genetic engineering. — *Photos. Res.* **39**: 115-135.
- Rathnam, C.K.M.** (1978). Heat Inactivation of Leaf Phosphoenolpyruvate Carboxylase: Protection by Aspartate and Malate in C₄ Plants. — *Planta* **141**: 289-295.
- Rathnam, C.K.M. et Edwards, G.E.** (1975). Intracellular localization of certain photosynthetic enzymes in bundle sheath cells of plants possessing the C₄ pathway of photosynthesis. — *Arch. Biochem. Biophys.* **171**: 214-225.
- Reinhart, G.D.** (1980). Influence of Polyethylene Glycols on the Kinetics of Rat Liver Phosphofructokinase. — *J. Biol. Chem.* **255**:10576-10578.
- Relle, M. & Wild, A.** (1996). Molecular characterization of a phosphoenolpyruvate carboxylase in the gymnosperm *Picea abies* (Norway spruce). — *Plant Mol. Biol.* **32**: 923-936.
- Rhodes, M.J.C.** (1977). The extraction and purification of enzymes from plant tissues. Dans: *Regulation of enzyme synthesis and activity in higher plants*. Proceeding of the Phytochemical Society Symposium. **14**: 245-269. Academic Press. London, New-York, San-Francisco.
- Richter, G.** (1993). *Métabolisme des végétaux: physiologie et biochimie*. Presses Polytechniques et Universitaires Romandes. Lausanne. 526p.
- Robert, G., Vezeau, M.-C. & Simon, J.-P.** (1983). Adaptation and Acclimation of Higher Plants at the Enzyme Level: Thermostability of Phosphoenolpyruvate Carboxylase of Population of a Weedy C₄ Grass Species, *Echinochloa crus-galli* (L.) Beauv. — *Photosynthetica* **17**: 557-565.

- Rouleau, E. & Lamoureux, G.** (1992). Atlas des plantes vasculaires de l'île de Terre-Neuve et des îles de Saint-Pierre et Miquelon. Ed. Fleurbec. Canada. 777p.
- Schlichting, C.D.** (1986). The evolution of phenotypic plasticity in plants. — *Ann. Rev. Ecol. Syst.* **17**: 667-693.
- Selinioti, E., Nikolopoulos, D. & Manetas, Y.** (1987). Organic Cosolutes as Stabilisers of Phosphoenolpyruvate Carboxylase in Storage: An Interpretation of their Action. — *Aust. J. Plant Physiol.* **14**: 203-210.
- Simon, J.-P.** (1979a). Differences in thermal properties of NAD malate dehydrogenase in genotypes of *Lathyrus japonicus* Willd. (Leguminosae) from maritime and continental sites. — *Plant Cell Environ.* **2**: 23-33.
- Simon, J.-P.** (1979b). Adaptation and acclimation of higher plants at the enzyme level: latitudinal variation of thermal properties of NAD malate dehydrogenase in genotypes of *Lathyrus japonicus* Willd. (Leguminosae) — *Oecologia* **39**: 273-287.
- Simon, J.-P.** (1979c). Adaptation and acclimation of higher plants at the enzyme level: Speed of acclimation for apparent energy of activation of NAD malate dehydrogenase in *Lathyrus japonicus* Willd. (Leguminosae). — *Plant Cell Environ.* **2**: 35-38.
- Simon, J.-P.** (1986). Molecular forms of kinetic properties of the mitochondrial fraction of NAD-malate dehydrogenase in four clones of *Lathyrus japonicus* (Leguminosae) from sites of contrasting climates. — *Can. J. Bot.* **64**: 2675-2681.
- Simon, J.-P.** (1987). Differential effects of chilling on the activity of C₄ enzymes in two ecotypes of *Echinochloa crus-galli* from sites of contrasting climates. — *Physiol. Plant.* **69**: 205-210.
- Simon, J.-P.** (1996). Molecular Forms and Kinetic Properties of Pyruvate, P_i Dikinase from two Populations of Barnyard Grass (*Echinochloa crus-galli*) from Sites of Contrasting Climates. — *Aust. J. Plant Physiol.* **23**: 191-199.
- Simon, J.-P., Potvin, C. & Blanchard, M.-H.** (1983). Thermal adaptation and acclimation of higher plants at the enzyme level: kinetic properties of NAD malate dehydrogenase and glutamate oxaloacetate transaminase in two genotypes of *Arabidopsis thaliana* (Brassicaceae). — *Oecologia* **60**: 143-148.
- Simon, J.-P., Potvin, C. & Strain, B.R.** (1984a). Effects of temperature and CO₂ enrichment on kinetic properties of phosphoenolpyruvate carboxylase in two ecotypes of *Echinochloa crus-galli* (L.) Beauv., a C₄ weed grass species. — *Oecologia* **63**: 145-152.
- Simon, J.-P., G. Robert, & M.-C. Vezeau** (1984b). Adaptation and Acclimation of Higher Plants at the Enzyme Level: Kinetic Properties of Phosphoenolpyruvate Carboxylase of Populations of a weedy C₄ Grass Species *Echinochloa crus-galli* (L.) Beauv. — *Photosynthetica* **18**: 391-401.
- Simon, J.-P., Potvin, C. & Strain, B.R.** (1989a). Effects of temperature and CO₂ enrichment on kinetic properties of NADP⁺-malate dehydrogenase in two ecotypes of barnyard grass (*Echinochloa crus-galli* (L.) Beauv.) from contrasting climates. — *Oecologia* **81**: 138-144.
- Simon, J.-P., Péloquin, M.-J. & Charest, C.** (1989b). Molecular forms and kinetic properties of malate dehydrogenase and glutamate oxaloacetate transaminase in Genlea and Kharkov wheat cultivars. — *Env. J. Exp. Bot.* **29**: 445-456.
- Simon, J.-P. & Vairinhos, F.** (1991). Thermal stability and kinetic properties of NADP⁺-malate dehydrogenase isomorphs in two populations of the C₄ weed species *Echinochloa crus-galli* (barnyard grass) from sites of contrasting climates. — *Physiol. Plant.* **83**: 216-224.

- Simon, J.-P. & Hatch, M.D.** (1994). Temperature Effects on the Activation and Inactivation of Pyruvate P_i Dikinase in Two Populations of the C₄ Weed *Echinochloa crus-galli* (Barnyard Grass) from Sites of Contrasting Climates. — *Aust. J. Plant Physiol.* **21**: 463-473.
- Slack, C.R.** (1968). The photoactivation of phosphoenolpyruvate synthase in leaves of *Amaranthus palmeri*. — *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **30**: 483-488.
- Somero, G.N.** (1978). Temperature adaptation of enzymes: biological optimization through structure-function compromises. — *Ann. Rev. Ecol. Syst.* **9**: 1-29.
- Somero, G.N. & Hochachka, P.W.** (1976). Biochemical adaptation to temperature. Dans: *Adaptation to environment*. : R.C. Newell éd. Butterworths. Toronto. pp. 125-190.
- Somero, G.N. & Low, P.S.** (1976). Temperature: A "shaping force" in protein evolution. Dans: *Biochemical Adaptation to Environment Change*. R.M.S. Smelli et J.F. Pennock (eds). Biochemical Society Symposium 41. Biochemical Society, London. pp. 33-42.
- Somero, G.N. & Graves, J.E.** (1982). Electrophoretic and functional enzymatic evolution in four species of Eastern Pacific barracudas from different thermal environments. — *Evolution* **36**: 97-106.
- Stowe, L.G. & Teeri, J.A.** (1978). The geographic distribution of C₄ species of the Dicotyledonae in relation to climate. — *Am. Nat.* **112**: 609-623.
- Takai, K., Sako, Y., Uchida, A. & Ishida, Y.** (1997). Extremely thermostable phosphoenolpyruvate carboxylase from an extreme thermophile, *Rhodothermus obamensis*. — *J. Biochem.* **122**: 32-40.
- Teeri, J.A.** (1979). The climatology of the C₄ photosynthetic pathway. Dans: *Topics in Plant Population Biology*. Solbrig, O.T., Jain, S., Johnson, G.B., Raven, P.H. (eds). Columbia Univ. Press. New-York. pp 356-374.
- Teeri, J.A. & Stowe, L.G.** (1976). Climatic Patterns and the Distribution Of C₄ Grasses in North America. — *Oecologia* **23**: 1-12.
- Teeri, J.A., Stowe, L.G. et Livingstone, D.A.** (1980). The distribution of C₄ species of the Cyperaceae in North America in relation to climate. — *Oecologia* **47**: 307-310.
- Ting, I.P. & Osmond, C.B.** (1973). Activation of plant P-enolpyruvate carboxylases. Characteristics of alloenzymes from leaves of C₃ and C₄ plants. — *Plant Physiol.* **51**:439-447.
- Toh, H., Kawamura, T. & Izui, K.** (1994). Molecular evolution of phosphoenolpyruvate carboxylase. — *Plant Cell. Environ.* **17**: 31-43.
- Turesson, G.** (1922). The species and the variety as ecological units. — *Hereditas* **3**:100-113.
- Turesson, G.** (1923). The scope and import of genecology. — *Hereditas* **4**:171-176.
- Uedan, K. & Sugiyama, T.** (1976). Purification and characterization of Phosphoenolpyruvate carboxylase from maize leaves. — *Plant Physiol.* **57**:906-910.
- Vairinhos, F. & Simon, J.-P.** (1990). Purification and molecular forms of NADP⁺-malate dehydrogenase from two populations of C₄ weed *Echinochloa crus-galli* (L.) Beauv. (Poaceae) — *Plant Sci.* **71**:173-177.
- Vojdani, F., Kim, W. & Wilkins, T.A.** (1997). Phosphoenolpyruvate carboxylase cDNAs from developing cotton (*Gossypium hirsutum*) fibers. — *Plant Physiol.* **115**:315-319.

- Vroman, H.E. & Brown, J.R.C.** (1963). The effect of temperature on the activity of succinic dehydrogenase from livers of rats and frogs. — *J. Cell. Comp. Physiol.* **61**:129-131.
- Wilkinson, G.N.** (1961). Statistical Estimations in Enzyme Kinetics. — *Biochem. J.* **80**:324-332.
- Wittwer, S.H.** (1980). The shape of things to come. Dans: *Biology of crop productivity*. P.S. Carlson (ed.). Academic Press. New-York. 471p.
- Yanagisawa, S., Izui, K.** (1989). Maize phosphoenolpyruvate carboxylase involved in C₄ photosynthesis: nucleotide analysis of the 5' flanking region of the gene. — *J. Biochem.* **106**:982-987.

Annexes

Annexe J.

Composition des solutions qui sont combinées pour produire la teinture spécifique à l'oxaloacétate utilisée pour détecter la PEPC, (modifiée de Kärn *et al.* (1973)).

Solution A

Solution tampon Tris-HCl (0,1M, pH 7,5),	12,5 ml
«Fast» violet B, SIGMA	62,5 mg
MgSO ₄	30,8 mg
KHCO ₃	62,5 mg
Phosphoénolpyruvate, SIGMA	50,0 mg
Cette solution est conservé à 4°C	

Solution B

Solution tampon Tris-HCl (0,1 M, pH 7,5)	12,5 ml
Agar (Difco)	250,0 mg
Cette solution est chauffé à 100°C jusqu'à dissolution de l'agar et ensuite conservée à 65°C, jusqu'à son utilisation.	

Annexe III.

Valeurs des F et degré de signification (P^1) des tests ANOVA effectués sur les valeurs de thermodénaturation à 47°C de la PEPC, pour chacun des trois degrés purification, afin de comparer les populations Québec et Mississippi.

Temps de dénaturation (min)	Valeur de F Séphadex G-25	Valeur de F PEG 13%	Valeur de F DEAE-sépharose
Contrôle	-	-	-
2	2,032 NS	51,506 **	0,002 NS
4	9,898 *	21,271 **	0,641 NS
6	14,970 *	23,137 **	0,954 NS
8	11,124 *	44,719 **	1,170 NS
10	10,518 *	34,197 **	5,212 NS
15	12,114 *	27,021 **	2,964 NS
20	15,951 *	37,509 **	2,989 NS
30	10,208 *	10,190 *	2,830 NS

¹ $P < 0,05$ * significatif, $P < 0,01$ ** très significatif, $P < 0,001$ *** hautement significatif, $P > 0,05$ NS non significatif.

Annexe III.

Valeurs des F et degré de signification (P^1) des tests ANOVA effectués sur les valeurs de K_m (PEP) de la PEPC, entre les populations de Québec et Mississippi, pour les trois niveaux de purification.

Température d'essai (°C)	Valeur de F Séphadex G-25	Valeur de F PEG 13%	Valeur de F DEAE-sépharose
5	-	4,499 NS	28,300 **
10	15,119 *	13,772 *	5,833 NS
15	15,361 *	13,066 *	5,065 NS
20	14,866 *	5,599 NS	8,393 *
25	1,176 NS	1,123 NS	7,665 NS
30	1,091 NS	1,127 NS	7,748 *
35	0,690 NS	4,813 NS	5,453 NS
40	0,755 NS	1,734 NS	10,189 *

¹ $P < 0,05$ * significatif, $P < 0,01$ ** très significatif, $P < 0,001$ *** hautement significatif, $P > 0,05$ NS non significatif.

Annexe III

Valeurs des F et degré de signification (P^1) des tests ANOVA effectués sur les valeurs de K_{cat} (PEP) de la PEPC purifiée, afin de comparer les populations de Québec et Mississippi.

Température d'essai (°C)	Valeur de F DEAE-sépharose
5	19,595 *
10	0,886 NS
15	1,480 NS
20	12,251 *
25	9,731 *
30	3,666 NS
35	160,464 ***
40	3,595 NS

¹ $P < 0,05$ * significatif, $P < 0,01$ ** très significatif, $P < 0,001$ *** hautement significatif, $P > 0,05$ NS non significatif.